

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2002年3月7日 (07.03.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/18562 A1

(51)国際特許分類7: C12N 9/76, 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10, C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, 33/15

(74)代理人: 前田純博(MAEDA, Sumihiro); 〒100-0011 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人株式会社 知的財産センター内 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/07349

(22)国際出願日: 2001年8月28日 (28.08.2001)

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2000-257104 2000年8月28日 (28.08.2000) JP
特願2001-59753 2001年3月5日 (05.03.2001) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 帝人株式会社 (TELJIN LIMITED) [JP/JP]; 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号 Osaka (JP).

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 江口広志 (EGUCHI, Hiroshi) [JP/JP]. 一寸木学 (CHOKKI, Manabu) [JP/JP]. 山村 聰 (YAMAMURA, Satoshi) [JP/JP]. 三田麗子 (MITA, Reiko) [JP/JP]. 横木津希夫 (MASEGI, Tsukio) [JP/JP]; 〒191-0065 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内 Tokyo (JP).

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: AIRWAY-SPECIFIC TRYPSIN-LIKE ENZYMES AND METHOD OF USING THE SAME

(54)発明の名称: 気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

(57) Abstract: A method of screening a compound or a polypeptide which inhibits AST activity, or inhibits PAR activation, mucus production promotion, cell proliferation, calcium flow into cells or EGFR pathway activation by AST; and a method of assaying AST *in vivo* and in biological cells or samples. ASTs which are mammalian AST proteins comprising the whole amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or 2 or a part thereof, or an amino acid sequence having a 66% homology with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and in which a propeptide moiety is bonded to a trypsin-like moiety via a disulfide bond; nucleic acids encoding the same; antibodies binding to the same; a method of assaying AST by using these antibodies; and a method of assaying the AST inhibitory activity or the activity of inhibiting PAR activation, mucus production promotion, cell proliferation, calcium flow into cells or EGFR pathway activation by AST of a compound or a polypeptide to be assayed.

[続葉有]

WO 02/18562 A1

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

本発明の課題は、AST活性を阻害、またはASTによるPAR活性化、粘液産生亢進、細胞増殖、細胞内カルシウム流入またはEGFR経路活性化を阻害する化合物もしくはポリペプチドのスクリーニング方法を提供する。さらに生体内および生体より得られた細胞や試料中のASTの測定方法を提供する。

本発明は、配列番号1もしくは配列番号2に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白または配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する哺乳類AST蛋白であって、プロペプチド部分とトリプシン様蛋白部分とがジスルフィド結合で連結されているAST。それらをコードする核酸。それらに結合する抗体。かかる抗体を用いてASTを測定する方法。さらには測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST阻害活性、またはASTによるPAR活性化または粘液産生亢進、細胞増殖、細胞内カルシウム流入またはEGFR経路活性化の阻害活性を測定する方法である。

明細書

気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

5 技術分野

本発明は新規に構造が明らかにされた気道特異的トリプシン様酵素蛋白に関する。また、本発明は該酵素の粘液分泌促進作用、炎症惹起作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、プロテアーゼ活性化受容体活性化作用の検出もしくは測定系を用いた、化合物またはポリペプチド（蛋白および抗体を含む）の阻害活性検出法に関する。

10

背景技術

近年、ヒトの慢性気道炎症患者の喀痰中からヒト気道トリプシン様酵素（以下、「気道特異的トリプシン様酵素」または「AST」（Airway Specific Trypsin-like Protease）という。）が精製され（特開平7-067640号公報、Yasuoka S. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 1997）、そのアミノ酸配列およびcDNA配列が明らかになっている（特開平8-89246号公報、U.S.-5804410、EP-699763、Yamaoka K. et al., J. Biol. Chem., 273(19): 11895-11901, 1998）。

この酵素のもつ活性については *in vitro* でいくつか検討がなされている。
20 粘液纖毛運動に対する関与をはじめ、ヒト気管支上皮細胞株からの IL-8、GM-CSFなどのサイトカインの産生増強作用を有することから（寺尾紀子ら、1998年度日本呼吸器学会）、気道炎症の病態への関与の可能性が考えられる。さらに、フィブリノーゲンの分解活性（Yoshinaga S. et al., J. Med. Invest., 45: 77-86, 1998）、およびプラスミノーゲンアクティベーター（プロウロキナーゼ）活性化作用などの酵素活性を有していることから（吉永純子ら、1998年度病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会（Conference on Proteases and Inhibitors in Pathophysiology and Therapeutics））、気道粘膜面におけるフィブリン形成を介して抗炎症的に作用したり、慢性気道疾患ではその病態を修飾している可能性が想定され、さらに癌転移などに関与している可能性も考えられている。
25 一方、プロテアーゼ活性によりシグナル伝達が惹起される受容体と定義されるプロテアーゼ活性化受容体（Protease Activated Receptor、以下「PAR」ともい

- う。)は、プロテアーゼによるシグナルを仲介している受容体であり、1991年にヒト血小板に存在するトロンビン受容体(ヒトPAR-1)がクローニングされた(Vu U K-H et al., Cell, 64: 1057-1068, 1991)。その後、マウスPAR-1(Coughlin, S. R., Unpublished, Accession No. L03529, 1992)、ラットPAR-1(Runge M. S. et al., J. Biol. Chem., 267: 16975-16979, 1992)、マウスPAR-2(Nystedt S. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91: 9208-9212, 1994)、ヒトPAR-2(Bohm S. K., Biochem. J., 314: 1009-1016, 1996)、ラットPAR-2(Saifeddine M. et al., Br. J. Pharmacol., 118 (3): 521-530, 1996)、ヒトおよびマウスPAR-3(Ishihara H. et al., Nature, 386: 502-506, 1997)、マウスPAR-4(Kahn M. L. et al., Nature, 394: 690-694, 1998)、ヒトPAR-4(Xu W-F et al., Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6642-6646, 1998)などがこれまでにクローニングされている。PAR-1およびPAR-2に関しては、炎症反応など様々な病態に関与しているという報告がこれまでに多数なされている(Dery O. et al., Am. J. Physiol., 274: C1429-C1452, 1998)。
- PAR-2の活性化に関しては、トリプシン(Nystedt S. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91, 9208-9212, 1994)およびトリプターゼ(Schwartz, L. B. et al., J. Immunol., 126: 1290-1294, 1981)がPAR-2を活性化することが報告されている(Molino M. et al., J. Biol. Chem., 272: 4043-4049, 1997)。
- PAR-2は、脾臓において脾液の分泌を調節したり(Bohm S. K., Biochem. J., 314: 1009-1016, 1996)、イオンチャネルの活性化などに関与しているという報告(Nguyen T. D. et al., J. Clin. Invest., 103: 261-269, 1999)の他、十二指腸の運動の調節などにも関与しているという報告がある(Kawabata A. et al., Br. J. Pharmacol., 128 (4): 865-872, 1999)。
- 一方、トリプターゼはマストセルから放出され、4量体としてのみ酵素活性を示し(Schwartz, L. B. et al., J. Biol. Chem., 256: 11939-11943, 1981)、皮膚炎症(Steinhoff M. et al., Exp. Dermatol., 8: 282-294, 1999)や肺の炎症(Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 278: L193-L201, 2000)に関与していることを示唆する報告がなされている。
- しかし、トリプターゼの作用とPAR-2の活性化に関してはまだ不明な点が多く、その他のPAR-2活性化酵素に関してはまったく未解明である。さらに気道においてPAR-2を活性化する酵素として、上述のトリプシノーゲンの気道における存在

を示唆する報告があるが、その活性や存在量に関しては全く不明であり、免疫組織染色により反応する蛋白の存在が示されているだけである (Cocks T. M. et al., Nature, 398: 156-160, 1999)。まして気道特異的にPAR2を活性化する酵素が存在することに関しては全くこれまで報告がない。

- 5 一方、慢性気道炎症疾患において、持続的な炎症とともに問題とされている病態として粘液分泌の過剰亢進による病態の悪化が挙げられる (Jeffery, P. K. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 150: S6-13, 1994)。上記疾患に属するD P B (びまん性汎細気管支炎)に対するエリスロマイシンのようなマクロライド系の薬剤の効果が日本において知られているが (Nagai, H. et al., Respiration, 58
10 (3-4): 145-149)、抗生物質であるため、欧米などでは好んで使用されているわけではない。

さらに粘液の過剰產生亢進や分泌細胞の増生に関して、主たる原因となるターゲット分子に関しては種々の説があるものの (Christian, P. et al., J. Clin. Invest., 85: 682-689, 1990)、それらに基づいて創製された薬剤の中に有効な治療薬
15 はいまだ存在していない。よって、C O P D (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) に代表される慢性気道炎症性疾患において、粘液の過剰な分泌產生亢進を抑制する有効な薬剤が世界的に望まれている。

発明の開示

20 本発明の課題は、活性を有する真の構造のA S T取得である。
また、活性を有する真の構造のA S Tによる粘液產生亢進作用、E G F R (Epidermal Growth Factor Receptor) 経路活性化作用、サイトカイン產生亢進などによる炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、P A R (プロテアーゼ活性化受容体、プロテアーゼ活性によりシグナル伝達が惹起される受容体と定義する) 活性化
25 作用を阻害する薬剤をスクリーニングする方法およびその阻害活性を検出するための評価系の構築である。

さらに、該構造を有するA S Tの活性を阻害する化合物またはポリペプチド (蛋白および抗体を含む)、または該構造を有するA S Tの粘液產生亢進作用、E G F R 経路活性化作用、炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、P A R 活性化
30 作用を阻害する化合物またはポリペプチドの薬効評価系を提供することである。

また、該構造の酵素と結合する抗体を取得し、測定系を構築することにより、分

泌系の異状、炎症性の疾患、凝固線溶系の異状、癌などの診断を行う手段を提供することである。

すなわち、本発明方法を利用することにより得られたA S T活性を阻害する化合物もしくはポリペプチド、またはA S Tによる粘液產生亢進作用、炎症亢進作用、
5 細胞内カルシウム流入作用、P A R活性化作用、E G F R経路活性化作用を阻害する化合物もしくはポリペプチドは、A S Tのもつ分泌細胞に対する分泌促進あるいは粘液產生亢進作用、凝固・線溶系における作用、気道リモデリングへの作用、気道炎症への作用、線維芽細胞・上皮細胞・せん毛細胞・平滑筋細胞・杯細胞の増殖および障害に対する作用、癌の増殖や転移に関する作用、粘液纖毛運動に対する作用、
10 抗ウイルス感染作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および治療に用いることが期待できる。

さらにA S TがP A Rを活性化することから、P A Rのもつ分泌細胞に対する分泌促進作用（粘液腺細胞、漿液腺細胞、杯細胞の粘液產生亢進作用、神經細胞・神經内分泌細胞への分泌亢進作用、気道上皮細胞におけるクロライドイオン分泌促進作用など）、上皮細胞あるいは内皮細胞を介した血管、気道、腸管などの弛緩作用や、平滑筋に対する収縮作用、線維芽細胞や上皮細胞などの炎症性サイトカイン産生誘導および増強作用、線維芽細胞・上皮細胞（纖毛細胞、杯細胞、基底細胞）・平滑筋細胞・分泌腺細胞などの細胞増殖および障害に対する作用、神經細胞に対する過敏性の増強作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および治療に用いることが期待できる。

さらにA S TがE G F R経路を活性化することから、E G F R活性化による作用として、分泌細胞（粘液腺細胞、漿液腺細胞、杯細胞、扁平上皮細胞、癌細胞など）に対する分泌物產生亢進作用やサイトカイン產生亢進作用、線維芽細胞や内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞などE G F R経路を有する様々な細胞に対する炎症性サイトカイン産生誘導および増強作用、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、せん毛細胞、杯細胞、基底細胞、扁平上皮細胞、癌細胞、平滑筋細胞、分泌腺細胞などE G F R経路を有する様々な細胞に対する細胞増殖作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、病態における改善および治療に用いることが期待できる。

以上のA S Tの直接的、間接的な作用から、慢性気道炎症（慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症を含む）、気管支喘息）、副鼻腔気管支症候群、肺線維症、気道過敏症、肺高血圧症、凝固線溶系異

常による疾患、広義の気道組織の癌、関節炎、皮膚の炎症性の疾患のための新しい治療薬スクリーニングの評価系、診断薬となり得るものである。

- 本発明者らは、以上の状況を鑑みて A S T の精製方法に関して鋭意研究した結果、
- 5 活性を有する A S T を喀痰中あるいは組換え昆虫細胞から効率よく精製する方法を確立した。その結果、より多くの A S T の取得が可能となった。この取得された精製蛋白を使用し、アミノ酸配列を決定した結果、精製された A S T の活性体の構造が、従来報告されていたトリプシン様蛋白類似のアミノ酸構造以外に、プロペプチドとトリプシン様蛋白部分がジスルフィド結合により連結された構造を有する蛋白
- 10 構造をもつ活性体が存在することを初めて明らかにした。

また、この酵素が気道組織、ことに気管支上皮や気管支腺、なかでも線毛上皮細胞、基底細胞に特異的に多く発現し、存在することを見出した。さらに該構造を有する A S T が P A R を活性化する能力を有することを知見した。また、 A S T が呼吸器由来の粘液分泌能を有する細胞株において粘液の産生量を亢進することを知見

15 した。本発明者らはこれらの知見に基づきさらに研究を進めた結果、本発明に到達した。

本発明者らは昆虫細胞で H A S T (すなわちヒト A S T) の c D N A 配列 (特開平
8-89246号公報、 U S - 5 8 0 4 4 1 0 、 E P - 6 9 9 7 6 3 、 および Yamao
20 ka K. et al., J. Biol. Chem., 273 (19): 11895-11901, 1998) に基づき、組換え
バキュロウイルスペクターを作製し、組換え蛋白を発現させた。ここから実施例 1
に示した精製方法により活性を有する蛋白を精製し、活性蛋白の一次構造を決定し
た結果、従来報告されているトリプシン類似の構造蛋白 (特開平 7-067640
号公報、 S. Yasuoka et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 199
25 7、 187 番目のイソロイシン (I I e) から始まるトリプシン様蛋白部分) 以外に、
1 番目のメチオニン (M e t) から 186 番目のアルギニン (A r g) の間のアミ
ノ酸配列からなるプロペプチドの一部の部分配列 (具体的には 145 番目のアスパ
ラギン (A s n) あるいは 162 番目のアスパラギン酸 (A s p) からはじまるプロ
ペプチド部分) がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合してい
30 る構造からなる蛋白を含んでいることを見出した。そして、この構造を有する蛋白
が活性のある A S T の主成分であることを発見した。

さらに、天然H A S Tを喀痰中から精製し、同様にアミノ酸配列を決定した結果、やはりプロペプチドの一部の部分配列（具体的には173番目のイソロイシン（I 1 e）からはじまるプロペプチド部分）が187番目のイソロイシン（I 1 e）から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合する構造蛋白が存在することを知見した。そして、この構造の蛋白が活性をもつA S Tの主成分であることを発見した。

一方、これまでH A S Tはヒトに特異的に存在すると考えられており、H A T (Human Airway Trypsin-like Protease)と命名されていた（特開平7-067640号公報、S. Yasuoka et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 16: p300-308, 1997）。しかし、本発明者らがいくつかのセリンプロテアーゼのホモロジーに基づいて作製したdegenerateプライマーを用い、マウスの気道より作製したc D N Aを鑄型とするP C R (Polymerase Chain Reaction)を施行し、得られたD N Aフラグメントの配列を決定した結果、直立二足歩行を行わないマウスなどの動物においてもH A S T様蛋白が存在することをはじめて見い出した。さらに、マウスのA S T様蛋白をコードする全長c D N Aを5' - R A C E (Rapid Amplification of cDNA Ends)、3' - R A C Eを施行することによって取得した。本発明者らは、この遺伝子発現の組織特異性を調べたところ、マウスにおいても気道特異的な発現が観察された。さらにこのようにして取得されたマウスA S T遺伝子を昆虫細胞において組換え体として発現させ、その蛋白一次構造を決定した結果、マウスA S TもヒトA S T(H A S T)と同様に、1番目のメチオニン(M e t)から186番目のアルギニン(A r g)の間のアミノ酸配列からなるプロペプチドの部分配列が187番目のイソロイシン(I 1 e)から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合している構造からなる酵素であることを明らかにした。同様の方法で、ハムスター、モルモットのA S Tのクローニングにも成功した。

また、上記と同様の方法を用い、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ウシなどの高等哺乳動物においてもH A S T様蛋白が存在することを初めて見い出した。具体的にはヒトおよびげっ歯類のA S Tのc D N A配列を基にデザインしたdegenerateプライマーを作製し、気道から抽出した全RNAから合成したc D N Aを鑄型としてP C Rを行い、A S Tの部分c D N A配列を增幅し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を基にR A C E用プライマーを作製し、5' - R A C E、3' - R A C Eを施行することによってH A S T様蛋白をコードする全長c D N Aを取得した。この

ようにして取得した哺乳類AST遺伝子をヒト培養細胞において一過性に発現させたところ、ヒトAST（HAST）と同様のトリプシン様活性を発現しうることが明らかとなった。さらに、サルAST遺伝子を昆虫細胞において組換え体として発現させ、その蛋白一次構造を決定した結果、IGGから始まるトリプシン様蛋白
5 部分のN末端アミノ酸配列とDQAAから始まるプロペプチドの一部のアミノ酸配列が等モルで検出された。そしてサルASTもヒトASTと同様に、1番目のメチオニン（Met）から186番目のアルギニン（Arg）の間のアミノ酸配列からなるプロペプチドの部分配列が、187番目のイソロイシン（Ile）から始まるトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合している構造からなる酵素
10 であることを明らかにした。

以上に述べた動物におけるASTの存在の発見は、動物のASTの遺伝子レベルあるいは蛋白レベルの発見を評価することを可能とし、動物疾患モデルにおいて動物ASTの発現や活性を評価することにより、該病態におけるASTの関与を明確にしていくのに非常に有用である。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてASTの発現を抑制したり、発現ベクターを導入してASTの発現を上昇させたりすることにより、病態モデル動物におけるASTの関与を調べることができる。さらに、動物モデルにおいてAST阻害剤あるいは阻害ポリペプチド（蛋白、抗体を含む）の薬効を評価するうえで重要となる、動物における種差を検討、評価するうえでも重要な情報を提供するものである。

20 つぎに、上記構造を有する組換えASTを組換えPAR発現昆虫細胞に作用させ、カルシウム流入を指標にPARの活性化を評価したところ、PAR1およびPAR2を発現させた昆虫細胞においてカルシウム流入を惹起し、ASTがPARを活性化することをはじめて見出した。

さらに、正常ヒト気道上皮細胞および気道上皮細胞株においてASTがPARを活性化し、カルシウム流入を惹起すること、および該構造のASTがPARを介したシグナル伝達系によりIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことをはじめて見出し、気道疾患においてASTがPARを介したシグナル伝達系によりその病態を修飾していることを明らかにした。そして、これに基づいて上記構造を有する組換え蛋白の酵素活性またはPAR活性化作用に基づくスクリーニング系を構築した。

30 さらに、ヒト粘液分泌細胞株において、該構造のASTが粘液産生を亢進すること、細胞内カルシウム流入を惹起すること、さらにはEGFR経路を活性化するな

としてIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことをはじめて見出した。そして粘液産生の亢進した慢性気道疾患においてASTが粘液産生を亢進すること、細胞内カルシウム流入惹起などを起こすこと、およびPAR、EGFR経路を活性化するなどしてIL-8産生増強や細胞増殖を引き起こすことにより、その病態を修飾していることを明らかにした。

さらに、これに基づいて上記構造を有する組換え蛋白の酵素活性または粘液産生亢進作用、PAR活性化作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、EGFR経路活性化作用およびIL-8産生増強作用または細胞増殖促進作用に基づくスクリーニング系を構築しうることを見出し、本発明を完成した。

10

すなわち本発明は、プロペプチド部分がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合する構造を有したASTである。

さらに該構造を有する酵素の粘液産生亢進作用、PAR活性化作用、細胞内カルシウム流入惹起作用、EGFR経路活性化作用およびIL-8産生増強作用または細胞増殖促進作用を指標とした阻害剤または阻害ポリペプチドのスクリーニング系である。

さらに本発明には、かかる構造のASTを産生する昆虫細胞等の動物細胞も含まれる。

また、該構造を有する酵素と結合する抗体であって、酵素免疫測定法により生体内の該酵素を検出し得る結合性を有するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または免疫組織染色において組織中および細胞中の該酵素を検出し得る結合性を有するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、または該酵素活性を阻害し得るモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体である。

さらに、本発明にはかかるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞等の動物細胞も含まれる。

本発明をさらに具体的に述べると以下のようになる。

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であつて、1番目のMetから186番目のArgの間のアミノ酸配列の全部もしくは一部からなるプロペプチド部分と、187番目のIleから418番目のIleまでの232アミノ酸の配列からなるトリプシン様蛋白部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有するAST。

(2) 配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する哺乳動物のA S Tカウンターパート蛋白であって、該プロペプチド部分に相当する部分と該トリプシン様蛋白部分に相当する部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳動物A S T。

- 5 (3) 配列番号2、27、29、31、33、35、37、または39に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であって、1番目のM e tから18番目もしくは186番目のA r gの間のアミノ酸配列の全部もしくは一部からなるポリペプチド部分と、186番目または187番目のI l eから417番目または418番目のI l eもしくはV a lまでの232アミノ酸の配列からなるポリペ
10 プチド部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳動物A S T。

(以下、上記(1)から(3)のいずれかの構造を有するA S Tを、単に「気道特異的トリプシン様酵素」もしくは「A S T」と記載する。)

- 15 (4) A S Tに特異的に結合する抗体。

(5) ヒトA S T活性を阻害するか、またはその活性化を阻害するモノクローナル抗体。

(6) 前記抗体を用いてA S Tを検出または測定する方法。

- 20 (7) 酵素基質と測定対象化合物もしくはポリペプチドを混合し、これらとA S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織を適切な条件下にインキュベートして該酵素基質と反応させ、その反応生成物を測定することにより測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S T阻害活性を検出する方法。

- 25 (8) A S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらにP A R発現細胞とを混合し、P A R活性化を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S TによるP A R活性化の阻害活性を検出する方法。

- 30 (9) A S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらに細胞内カルシウム流入能を有する細胞とを混合し、細胞内カルシウム流入を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S Tによる細胞内カルシウム流入の阻害活性を検出する方法。
- (10) A S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合

物もしくはポリペプチドと、さらに粘液分泌能を有する細胞とを混合し、分泌物を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S Tによる粘液產生亢進作用の阻害活性を検出する方法。

- (1 1) A S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらにE G F R-L (E G F R-リガンド) を有する細胞とを混合し、E G F R-L の遊離量を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S TによるE G F R-L の遊離能の阻害活性を検出する方法。
- (1 2) A S Tもしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらにE G F Rシグナル伝達経路を有する細胞とを混合し、E G F R経路のシグナル伝達を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドのA S TによるE G F Rシグナル伝達系活性化作用の阻害活性を検出する方法。
- (1 3) 天然哺乳類A S T遺伝子のコード領域。
- (1 4) 哺乳類A S T遺伝子由来のm R N A またはc D N A。 ([例] 配列番号3、4、5、6、26、28、30、32、34、36、38)
- 15 (1 5) 哺乳類A S T。
- (1 6) 前記(1 3) または(1 4) の核酸を用いて作製された発現ベクター。それがトランスフェクトもしくはトランسفォームされた細胞。その細胞からA S Tを精製する方法および精製されたA S T。
- 20 (1 7) 前記核酸の全体もしくは一部の情報を用いて、それらの核酸に対応するA S T遺伝子の発現量を検出する方法。
- (1 8) A S Tの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、A S Tの活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。
- 25 (1 9) A S Tによる粘液產生亢進、炎症亢進、細胞内カルシウム流入惹起、E G F R経路活性化、P A R活性化により特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、A S Tによる粘液產生亢進作用、サイトカイン產生亢進などによる炎症亢進作用、細胞内カルシウム流入作用、P A R活性化作用、E G F R経路活性化作用を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。
- 30 (2 0) A S Tの活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾

患者をもつ哺乳類に対し、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する薬剤を投与することにより、ASTの活性阻害またはその活性化阻害による治療効果を判定する方法。

5 図面の簡単な説明

図1は、EGF-L添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

図2は、本発明のHASTまたはEGF-L添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

10 図3は、本発明のHASTおよびセリンプロテアーゼ阻害剤添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

図4は、本発明のHASTあるいは加熱処理HAST添加による粘液分泌細胞株NCI-H292におけるAB-PAS染色結果を示す。

15 図5は、本発明のHASTを添加した粘液分泌細胞株NCI-H292にプロテアーゼ阻害剤を同時に添加したときのMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

図6は、本発明のHASTを添加した粘液分泌細胞株NCI-H292にEGF-R中和抗体あるいはプロテアーゼ阻害剤を同時に添加したときのMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

20 図7は、本発明のAST、トリプシン、トリプターゼ、またはエラスターーゼを添加した粘液分泌細胞株NCI-H292におけるMuc5ACのmRNA量の測定結果を示す。

図8は、本発明のASTによる気道上皮細胞株BEAS-2BからのIL-8遊離亢進がプロテアーゼ阻害剤により抑制される測定結果を示す。

25 図9は、本発明のASTによる気道上皮細胞株BEAS-2BからのIL-8遊離亢進が転写レベルで起こることを示す。

図10は、本発明のASTが粘液分泌細胞株NCI-H292においてEGFRのチロシンリシン酸化を亢進させたことを示す。

図11は、ヒトASTとマウスASTのアミノ酸配列の相同性を比較した図である。

30 図12は、本発明のASTによるPAR発現昆虫細胞におけるカルシウム流入を示す。

図13は、正常ヒト気道上皮細胞を用いた本発明のASTによるカルシウム流入を示す。

図14は、気道上皮細胞株を用いた本発明のASTによるカルシウム流入を示す。

図15は、本発明の抗AST抗体の阻害活性の評価結果を示す。

5 図16は、本発明の抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系の、組換えASTに対する標準曲線を示す。

図17は、本発明の抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系により喀痰中のASTを測定した結果を示す。

10 図18は、本発明の抗ASTモノクローナル抗体と抗ASTポリクローナル抗体の組換えASTに対する液相抗原反応性を調べた結果を示す。

図19は、本発明の抗ASTモノクローナル抗体と抗ASTポリクローナル抗体を用いた測定系の、組換えASTに対する標準曲線を示す。

発明を実施するための最良の形態

15 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる本発明の気道特異的トリプシン用酵素においては、プロペプチド部分とトリプシン様蛋白部分とが173番目のCysと292番目のCysとのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。配列番号2に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる本発明の気道特異的トリプシン用酵素については、プロペプチド部分に相当する部分とトリプシン様蛋白部分に相当する部分が172番目のCysと291番目のCysとのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。配列番号1に示されるアミノ酸配列と66%以上のホモロジーを有する本発明の哺乳類気道特異的トリプシン用酵素については、プロペプチド部分に相当する部分とトリプシン様蛋白部分に相当する部分とが、配列番号1に示されるASTのそれぞれ173番目のCysと292番目のCysに相当するシステイン部分とのジスルフィド結合で連結されているものが好ましい。

ヒトASTの場合、かかるプロペプチド部分としては、そのN末端（アミノ末端）アミノ酸が、1番目のMetから170番目のIleの間のアミノ酸であるもの、44番目のAspから170番目のIleの間のアミノ酸であるもの、145番目のAsnから170番目のIleの間のアミノ酸であるものが好ましい。特に145番目のAsn、162番目のAspもしくは170番目のIleのいずれか

から、C末端（カルボキシ末端）が186番目のArgまでであるものが好ましい。
162番目のAspもしくは170番目のIleのいずれかから、186番目のArgまでであるものが最も好ましい。

本発明の前記ASTに特異的に結合する抗体としてはモノクローナル抗体が好ましく、ヒトAST活性を阻害するか、またはその活性化を阻害するものが特に好ましい。

本発明の抗体を用いるASTの検出または測定方法としては、酵素免疫測定法を用いるものが好ましい。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのAST阻害活性スクリーニング方法において使用されるASTあるいはAST発現細胞は、本発明の構造を有するASTあるいは該ASTを產生している細胞であればよく、AST発現細胞もしくは器官、組織が口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織由来であるか、またはそれらの組織に由来する細胞もしくはそれらの細胞株であるものが好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。特に上皮細胞、ことに線毛上皮細胞あるいは基底細胞もしくはそれら由来の細胞株が好ましい。評価に供するには精製された、前記構造を有する本発明のASTが最も好ましい。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによる粘液産生亢進作用に対する阻害活性のスクリーニング方法において、粘液産生亢進作用の指標としては、粘液糖タンパクのAB-PAS染色法による染色量、高分子硫酸ラベル体の放出量、ムチンの產生量、ムチン（特にMuc 5 AC）のmRNA発現量、ムチン（特にMuc 5 AC）のプロモーターの転写活性、EGFレセプターのリガンドの產生量または遊離量、EGFレセプターシグナル伝達経路に関与する蛋白のチロシンリン酸化体の量、MAPK(MAP kinase)のリン酸化体の量が好ましく挙げられる。

本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるEGFR経路活性化作用に対する阻害活性スクリーニング方法において、EGFR経路活性化の指標としては、EGFR-L (EGFR-Ligand) の切断や遊離量、またはすでに報告されているEGFRシグナル伝達系 (Wells A., Int. J. of Biochem. & Cell Biology, 31: 637-643, 1999) の測定対象物、またはそのシグナル伝達の結果おこる現象などを用いてASTによるEGFRシグナル伝達系の活性化を測定する

ことが可能である。

例えば、細胞増殖アッセイや、NFkB、AP-1などの転写エレメントを含む遺伝子(IL-8、IL-6、GM-CSFなど)の転写活性や生成蛋白の測定、細胞内におけるイノシトールリン酸の分解活性の測定、プロスタグランジンE₂産

5 生の測定、トロンボキサンA₂の測定、cAMP (cyclic AMP) の測定、粘液産生量の測定、ムチンの産生量、ムチン(特にMuc 5 AC)のmRNA発現量、ムチン(特にMuc 5 AC)のプロモーターの転写活性、EGFレセプターシグナル伝達経路に関する蛋白のチロシンリン酸化体の量(EGFRやMAPK(MAP kinase)などのリン酸化体の量)などである。

10 本発明の、測定対象化合物もしくはポリペプチドのASTによるPAR活性化作用に対する阻害活性スクリーニング方法において、PAR活性化のシグナル伝達の指標としては、すでに報告されている測定対象物を用いてASTによるPARのシグナル伝達系の活性化を測定することが可能である。

15 例えば、細胞内カルシウム流入や、細胞増殖アッセイ、NFkB、AP-1などの転写エレメントを含む遺伝子(IL-8、IL-6、GM-CSFなど)の転写活性や生成蛋白の測定、細胞内におけるイノシトールリン酸の分解活性の測定、プロスタグランジンE₂産生の測定、トロンボキサンA₂の測定、cAMP (cyclic AMP) の測定、NO (Nitric Oxide) の生成を直接または間接に測定する方法、Xenopus Oocyteを用いたカルシウムの放出や電

20 流の測定、クロラライドチャネルを介したクロラライドイオントransport量の測定、粘液分泌量の測定などである。

また、AST発現細胞は、該酵素発現組換え細胞であることが好ましい。さらに、AST発現細胞もしくは該酵素発現組織としては、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織由来であるか、またはそれ25 らの組織に由来する細胞、器官または組織、もしくはこれらの細胞株が好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。特に上皮細胞、なかでも気道上皮細胞、ことに線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、AST発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株などが挙げられる。

30 分泌を評価する細胞としては、粘液分泌細胞株であるNCI-H292が例示さ

れるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する分泌能力を有する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。かかる組織に由来する細胞もしくは細胞株には、癌細胞、癌細胞株が含まれる。ほかに、分泌能力を有する細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由來の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由來の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由來の細胞株が好ましく挙げられる。細胞株として樹立されたNCI-H292細胞やA549細胞などが評価に供するには最も好ましい。

P AR発現細胞としては、P AR発現組換え昆虫細胞が例示されるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、P AR発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由來の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由來の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由來の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、神経細胞などが好ましく挙げられる。細胞株として樹立されたBEAS-2Bなどが評価に供するには最も好ましい。

P ARの具体例としては、ASTによって活性化されるプロテアーゼ活性化受容体であればよく、既知のPAR1、PAR2、PAR3、PAR4のなかではPAR1、PAR2が好ましく、上記4種のPARのなかではPAR-2が最も好ましい。

EGFR-L発現細胞としては、組換えEGFR-L発現動物細胞が例示されるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する細胞株が好ましい。ほかに、EGFR-L発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由來の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由來の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由來の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、神経細胞などが好ましく挙げられる。

具体的には細胞株として樹立されたHCl-H292、A549などである。評価に供するには組換えEGFR-L発現組換え昆虫細胞または動物細胞が好ましい。

EGFR-Lの具体例としては、ASTによって遊離するEGFR-Lであればよく、既知のEGF、HB-EGF、TGF- α 、Amphiregulin、B

*etacellulin*などが挙げられる。なかでもEGF、HB-EGFが好ましく、EGFが最も好ましい。

EGFR発現細胞としては、NCI-H292細胞株が例示されるが、口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支もしくは肺組織に存在する細胞、器官または組織、特に気道上皮細胞、なかでも線毛上皮細胞、扁平上皮細胞または基底細胞もしくはそれらに由来する癌細胞または細胞株が好ましい。ほかに、EGFR発現細胞としては、杯細胞もしくは杯細胞由来の細胞株、粘液腺細胞もしくは粘液腺細胞由来の細胞株、漿液腺細胞もしくは漿液腺細胞由来の細胞株、気道平滑筋細胞、肺線維芽細胞、神経細胞もしくはそれら由来の細胞株などが好ましく挙げられる。最も好ましくは、細胞株として樹立されたHCI-H292、A549などである。

EGFR-Lの具体例としては、ASTによって遊離するEGFR-Lであればよく、既知のEGF、HB-EGF、TGF- α 、Amphiregulin、*Betacellulin*などが挙げられる。なかでもEGF、HB-EGFが好ましく、EGFが最も好ましい。

本発明の哺乳類AST遺伝子由来のmRNAまたはcDNAとしては、マウスのものが例示される。例えば配列番号5または配列番号6で示されるASTをコードするmRNAまたはcDNAである。同様に、本発明の哺乳類のASTとしては、サル、ブタ、イヌ、ウサギ、ウシ、ハムスター、モルモットなどのものが例示され、具体的には配列番号27、29、31、33、35、37、39で示されるASTをコードするmRNAまたはcDNAが挙げられる。

本発明には、これらの核酸配列の全体もしくは一部の情報を用いて作製された本発明のASTの発現を指示する発現ベクター、それがトランスフェクトもしくはトランスフォームされた細胞、その細胞を培養し、培養液あるいは培養細胞から本発明の構造を有する活性ASTを回収することからなるASTの製造方法、さらにはその製造方法によって得られるASTが含まれる。さらに、本発明には天然哺乳類ASTが存在する哺乳類の体液、細胞、または細胞株から精製された天然哺乳類ASTも含まれる。

さらに本発明は、これらの核酸の全体もしくは一部の情報を用いて、それらの核酸に対応するAST遺伝子の発現量を検出する方法であるが、その検出手法としてはノーザンハイブリダイゼーション法、遺伝子増幅法が例示される。本発明には、

こうした遺伝子増幅法の実施に用いられる、天然哺乳類A S T 遺伝子配列の情報、例えばそのc D N A配列の情報に基づいて作製されたセンスプライマーまたはアンチセンスプライマーも含まれる。

本発明はさらに、上述のA S T の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与することからなる、A S T の活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法である。

かかるA S T の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患としては、慢性気道炎症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症、喘息、副鼻腔気管支症候群、線維症、神経過敏症、凝固線溶系異常による疾患、癌、関節炎、または皮膚の炎症性の疾患が挙げられる。特に、呼吸器系における炎症性の疾患もしくは口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支、肺組織における分泌異状、細胞外基質合成異状、細胞増殖異状、細胞分化異状、神経系の異状、免疫系の異状、粘液線毛輸送系の異状、または凝固線溶系異状による病態がもたらす疾患が例示される。

かかるA S T による粘液産生亢進、炎症亢進、細胞内カルシウム流入惹起、E G F R 経路活性化、P A R 活性化により特徴づけられる疾患としては、慢性気道炎症、慢性閉塞性肺疾患、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症、喘息、副鼻腔気管支症候群、線維症、神経過敏症、凝固線溶系異常による疾患、癌、関節炎、または皮膚の炎症性の疾患が挙げられる。特に、呼吸器系における炎症性の疾患もしくは口腔組織、鼻腔組織、副鼻腔組織、咽頭組織、喉頭組織、気管、気管支、肺組織における分泌異状、細胞外基質合成異状、細胞増殖異状、細胞分化異状、神経系の異状、免疫系の異状、粘液線毛輸送系の異状、または凝固線溶系異状による病態がもたらす疾患が例示される。

また、本発明は上述した本発明の核酸の一部を用いて作製されたアンチセンスオリゴヌクレオチドであるが、本発明には上述のA S T の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対し、かかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する薬剤を投与することにより、A S T の活性阻害またはその活性化阻害による治療効果を判定する方法、ならびにかかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する該疾患の治療薬も含まれる。このようなA S T の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患の具

体例としても、上述したものと同じ疾患が例示される。

本発明の実施例13、14においてはNCI-H292細胞株を用いてASTの粘液産生亢進作用の評価を行っているが、AST阻害剤の粘液産生亢進阻害スクリーニング系に用いる細胞としては、分泌能を有する細胞が望ましく、呼吸器系における分泌能を有する細胞、器官または組織がより好ましい。細胞株として樹立されたNCI-H292細胞やA549細胞などが評価に供するには最も好ましい。

指標となる分泌物としては、有機物、無機物があるが、有機物としては糖タンパクが好ましく、より好ましくは粘液であり、この構成成分であるムチンが分泌指標として病態との関連から最も好ましい(Tsuda, T. et al., 「呼吸器疾患の分子生物学」: 87-92, 1998)。さらにムチンのなかでもCOPDなどの過分泌の病態において注目されているMuc5AC(Meerzaman, D. et al., J. Biol. Chem., 269: 12932-12939, 1994)、Muc2(Gum, J. R. Jr. et al., J. Biol. Chem., 269(4): 2440-2446, 1994)などが特に好ましい。

粘液産生亢進作用に基づくHAST阻害剤スクリーニング系における測定指標の実施形態としては、(1)糖蛋白レベルでは、ムチン抗原に対する抗体であるモノクローナル抗体17Q2(ヒト気道ムチンを抗原とする)(Thomas, E. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 14: 104-112, 1996)などによる酵素免疫測定法や、実施例13で示される粘液染色法(AB-PAS染色)および高分子硫酸ラベル体の放出量の測定などが好ましく挙げられる。(2)遺伝子レベルでは、ムチン(Muc5AC、Muc2が好ましい)のmRNA量を測定する方法として、実施例14で開示されているリアルタイムPCR法や、遺伝子の転写活性を評価する方法としてムチンのプロモーター領域を利用したレポータージーンアッセイ系などが好ましく挙げられる。

また、実施例14により示されるようにHAST活性に基づくMuc5ACのmRNA量の上昇がEGFR中和抗体によりブロックされることから、EGFR経路のシグナル伝達がASTによる粘液産生亢進の主たる経路(Takeyama, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 3081-3086, 1999)のひとつになりうることが推定され、このEGFRのシグナル伝達経路に関与する反応(Louis, M. L. et al., Current Opinion in Cell Biology, 11: 177-183, 1999)を定量化することにより、AST阻害剤の効果を測定することが可能である。上記に関連する経路において定量化ができるものであれば、すべて測定指標として使用できる可能性があ

る。たとえば、ターゲット細胞におけるEGF-Rのチロシン残基のリン酸化やMAPK (mitogen-activated protein kinase) のリン酸化などを免疫測定法を用いて指標とすることができる。

- 粘液産生亢進作用に基づくAST阻害剤スクリーニング系の実施形態としては、
- 5 粘液分泌能を有する組織、器官または培養細胞に対してASTを添加し、そこに化合物などを加えて分泌物の量、mRNA量または該遺伝子の転写活性などを測定することにより、粘液産生阻害効果を測定する方法が挙げられる。また、上記したように、器官または細胞培養上清中のEGFR-Lの含有量を直接測定する方法、または間接的に他の細胞系に添加して測定する方法などによっても阻害効果を判定することができる。測定対象となるEGFR-Lとしては、EGF (Epidermal Growth Factor, Carpenter, G. et al., J. Biol. Chem., 265: 7709-7712, 1990)、HB-EGF (Heparin-binding EGF-like Growth Factor, Abraham, J. A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 190: 125-133, 1993)、TGF- α (Transforming Growth Factor- α , Lee, D. C. et al., Pharm. Rev.; 47: 51-85, 1995)、Ampiphiregulin (Plowman, G. D. et al., Mol. Cell. Biol., 10: 1969-1981, 1990)、Betacellulin (Shing, Y. et al., Science, 259: 1604-1607, 1993) などが好ましく挙げられる (Gerhard, R. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1333: F179-F199, 1997)。特にEGF、HB-EGFが好ましい。
- 10
- 15

20 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

[実施例1] ASTの調製

25 咳痰中からの活性型天然ASTの精製は、以下に述べる組換えASTを精製した方法と同様の方法により実施した。

組換えHATの精製に関しては、特開平8-89246号公報、US-5804410、EP-699763およびYamaoka K. et al., J. Biol. Chem., 273 (19): 11895-11901, 1998に開示されているcDNA配列に基づいて組換えパキュロウイルスベクターを調製し、昆虫細胞に感染させることにより組換えAST (rAST) を產生させ、その細胞画分よりrASTを精製した。すなわち、昆虫細胞 (T

n - 5 細胞) を単層で 5×10^6 個/mL の密度まで生育させ、培地を除去した後、細胞あたり M O I (Multiplicity of Infection) = 0. 2 - 0. 5 になるように組換え A S T 発現バキュロウイルスを含む無血清培地を加えて感染させ、3日間培養し、A S T を発現させた。発現した蛋白質の確認は、S D S - P A G E および抗 A S T ベプチド抗体を用いたウエスタンプロット法 (Anal. Biochem., 112, 195-203, 1981) によって行った。

遠心分離 (約 $500 \times g$) で上清と細胞を分離した。450 mL に相当する細胞を M - P E R (Mammalian Protein Extraction Reagent, PIERCE 社製) 100 mL に懸濁し、室温で 30 分インキュベートした。さらに超音波破碎を 15 分間 10 氷上で行い、可溶化した。得られた可溶化物を 10000 rpm、4°C で 30 分間 遠心し、上清を回収した。回収した上清を 1 リットルの 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 4) / 0.01% P E G 6000 にて室温で 2 時間攪拌しながら透析したのち、4°C、10000 rpm で 30 分間遠心して上清を回収した。

次にこの試料に B S A を添加し (終濃度 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$)、2 リットルの 50 mM Tris - HCl (pH 8) / 0.5 M NaCl / 0.01% P E G 6000 にて 2 回透析した後、4°C で 10000 rpm、30 分間遠心して上清を回収した。回収した上清をベンザミジンセファロース 6 B (10 mL ベッドボリューム) にのせ、100 mL の 50 mM Tris - HCl (pH 8) / 0.5 M NaCl / 0.01% P E G 6000 にてカラムを洗浄した。さらに 80 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) にてカラムを洗浄したのち、10 mM HCl (pH 2) にて結合蛋白を溶出した。溶出後、各フラクションについて吸光度 (280 nm) を測定し、メインピークを集めた。そして S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) を行って分子量約 30 kD の蛋白質を検出、確認し、これを精製 r A S T 標品として凍結保存した。

25

[実施例 2] A S T の活性測定

トリプシン用合成基質 B o c - P h e - S e r - A r g - M C A (MCA: メチルクマリンアミド) を $100 \mu\text{M}$ 、B S A を 0.01% 含有する 50 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 8.6) 1.0 mL に A S T 含有溶液を $50 \mu\text{L}$ 加え、30 7°C で 1 時間インキュベートした。次いで 1 mL の 30% 酢酸を加え、生成した 7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC) 量を 蛍光測定により定量し (蛍光 460

nM、励起光380nm)、酵素活性を算出した。1分間に1pMのAMCを生成させる活性を1単位と定義する。

[実施例3] 組換えASTおよび天然ASTのアミノ酸配列の決定

5 実施例1で得られた精製蛋白につき、還元および非還元条件下でSDS-PAGEを行った。電気泳動後のゲル中の蛋白をPVDF(polyvinylidene disulfide)膜(イモビロン-Pトランスファー膜、Millipore社)にトランスファーした後、クマシーブルーR-250溶液(0.1%の50%メタノール溶液)中で染色し、約30kD付近のAST蛋白のバンドを切り出し、そのアミノ酸配列を
10 決定した。

その結果、昆虫細胞発現組換えASTに関しては、還元条件下では、I-L-G-Gからはじまるアミノ酸配列が確認された。非還元条件下では、3種類のバンドを確認することができた。分子量の大きいものからそれぞれ(a)、(b)、
15 (c) とすると、銀染色により推定された蛋白量としては(a)8%、(b)8%、(c)5%の含有率であった。それぞれのバンドを切り出して決定されたア
ミノ酸配列は、

- (a) N-S-G-N-L-E-I-N および I-L-G-G-T-E-A-E
Eそれぞれ等モル
(b) D-Q-A-A-A-N-W-L および I-L-G-G-T-E-A-E
Eそれぞれ等モル
(c) I-L-G-G-T-E-A-E

からはじまるアミノ酸配列であった。以前、報告されているASTは(c)の構造を有する蛋白である。

以上のことから、精製されたrASTは、メインバンド(87%)が(b)の構
25 造であり、D-Q-A-A-A-N-W-LからはじまるプロペプチドとI-L-G-G-T-E-A-Eからはじまるトリプシン様蛋白部分とがジスルフィド結合
している構造物が主体であることが明らかとなった。この構造物が活性を有するものである。

一方、喀痰から精製したASTに関しては、還元条件下では、既報のI-L-G-Gから始まるアミノ酸配列が確認された。一方、非還元条件下ではI-L-G-Gのほかにそれぞれアミノ酸のピークを確認することができ、その配列は、I-N

—E—B l a n k —G—A—G—Pと読み取れた（最初のIに関してはメインピークと同一）。この配列は、プロペプチドの170番目のIから始まるヒトASTのアミノ酸配列と一致し、組換えASTと同様に喀痰由来の天然ASTもプロペプチドとジスルフィド結合している構造が主体であることが初めて明らかとなった。ジ
5 スルフィド結合のプロペプチド（軽鎖）側のシステインは173番目のシステインであり、トリプシン様酵素部分（重鎖）は他のトリプシン類との構造の相同意比較より292番目のシステインに相当するシステイン部分でジスルフィド結合によつて連結されている構造であることが判明した。

10 [実施例4] 各種組換えヒトPAR発現細胞の調製

(1) PAR cDNAの取得とPAR cDNA含有トランスファーベクターの作製
正常ヒト気道上皮細胞よりRNAを抽出し、cDNA合成キット（アマシャム
ファルマシア バイオテク社製）を用いてcDNAを合成し、プライマーPAR1
F（配列番号7）およびPAR1R（配列番号8）によりPAR-1を、プライマ
15 -PAR2F（配列番号9）およびPAR2R（配列番号10）によりPAR-2
を、プライマーPAR3F（配列番号11）およびPAR3R（配列番号12）に
よりPAR-3をPCR増幅した。また、ヒト前立腺由来cDNA（Clontech
chより購入）の1/100量を用いてプライマーPAR4F（配列番号13）お
よりPAR4R（配列番号14）によりPAR-4をPCR増幅した。そのPCR
20 反応液をアガロースゲル電気泳動した結果、PAR-1ないしPAR-4のcDN
Aフラグメントのバンドが認められた。このDNAフラグメントをDNA精製キット
ト（QIAGEN社製QIAEXII使用）を用いてゲルから抽出、精製した。精製
したDNAフラグメントをEcoRI、BamHI（PAR4に関してはBglI
I）で切断し、パキュロウイルストラ NS ファーベクター pVL1393 (Inv
25 trogen社) を制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断したものとライゲ
ーション反応を行った。この反応液を用いて大腸菌JM109株を形質転換し、い
くつかの形質転換体のコロニーからプラスミドを抽出し、数クローニについてプラ
スミド精製（QIAGEN社製プラスミド抽出キット使用）を行った。これらの精
製プラスミドを用いてABI社製蛍光自動シーケンサーによりDNA配列を決定し
30 た結果、これらDNAフラグメントがPARをコードしていることが明らかになつ
た。

(2) P A R 発現用組換えバキュロウイルスの作製

組換えバキュロウイルスの作製にはファーミジエン社製の BaculoGoldTM マトリックストランスクレクションキットを用いた。昆虫細胞 Sf9 を 1×10^6 細胞/mL で 35 mm ディッシュに播種し、30 分間室温にて接着させた。一方、0.5 mg の BaculoGoldTM DNA と 2 μg の pVL-PAR プラスミド DNA を混ぜ、室温に 5 分間静置し、その後、0.5 mL トランスクレクションバッファー B (25 mM HEPES, pH 7.1, 125 mM CaCl₂, 140 mM NaCl) を加えてよく混ぜた。次に播種した Sf9 細胞の培地を抜き取り、0.5 mL のトランスクレクションバッファー A (グレース培地、10% 牛血清含有) を加えた。ここに、トランスクレクションバッファー B と DNA の溶液を少しづつ滴下していくことにより、コトランスクレクションを行った。27°C でインキュベーションし、4 時間後に新しいグレース培地 (10% 牛血清含有) に取り換えた。5 日後、組換えウイルスを含む培養上清を回収し、培養上清 100 μL と EX-CELL 405 培地 200 μL を調製し、Sf9 細胞 (1×10^6 細胞/ディッシュ) に室温で 1 時間感染させた。上清を抜き取り、1% SeaPlaque アガロース含有グレース培地 (42°C) を 2 mL 滴下して加え、アガロースが固まるまで 10 分間室温に放置した。その後、27°C で 5 日間培養した。5 日目にニュートラルレッド / PBS (Phosphate Buffered Saline) (0.1 g/L) を 1 mL / ディッシュ加えた。6 日目にウイルスプランクを観察し、プランクを確認した。数個のシングルウイルスプランクをアガロースごとバストールピペットで抜き取り、グレース培地と混ぜてウイルスを培地中に拡散させた。このシングルプランク由来のウイルス液を単層培養した Sf9 細胞 (25 cm² フラスコ培養) に感染させた。これを 27°C で 5 日間培養してウイルス液を回収した。このウイルス液を 1 mL とて 1.5 mL エッペンドルフチューブに入れ、4°C、15000 回転/分で 30 分間遠心し、ウイルス粒子を沈殿させた。沈殿物を 200 μL の TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) 緩衝液に懸濁し、50 μL の Lysis 缓衝液 (10% SDS, 1 mM EDTA) を加え、60°C で 20 分間インキュベートした。さらにフェノール / クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により反応液中のウイルス DNA を回収した。回収したウイルス DNA の 1/10 を用い、プライマー BacF (配列番号 15) および BacR (配列番号 16) によって PCR 増幅を行い、DNA 中に PAR cDNA が含有されていることを確認し

た。このPAR発現用組換えバキュロウイルスをVL-PARと命名した。ウイルス液は適宜希釈してブラークアッセイを行い、タイマーをチェックした。さらに、ウイルス液をSf9細胞に感染させることで $1 - 5 \times 10^7$ p.f.u (plaque forming unit) /mL程度の高濃度のウイルス液を得た。ウイルス液は4°Cおよび-85°Cで保存した。

(3) 組換えバキュロウイルスによるPARの昆虫細胞における発現
上記のようにして得られたPAR発現用組換えバキュロウイルスVL-PARを、
75cm² フラスコに播種した 1.0×10^7 のSf9細胞にMOI=2で感染させ、40時間、27°Cで静置培養した。培養後、感染細胞を回収し、カルシウム流入実験によってPARの機能を有することの確認を行った。

[実施例5] PAR発現昆虫細胞を用いたヒトASTによるカルシウム流入評価
回収した感染細胞（約 5×10^6 細胞）をHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-) pH7.4で1回洗浄した後、5mLのHEPES-Tyrode緩衝液（1μg/mL、Fura2-AM含有）に懸濁してFura2-AMを27°Cで30分間負荷した。800rpmで5分間、室温で遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-) pH7.4で2回洗浄した後、5mLのHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-) pH7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に5μLの1M CaCl₂を加えて最終濃度1mM CaCl₂になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100μL/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(+) pH7.4を80μL/ウェルで分注し、Fluorescence Drug Screening System（浜松ホトニクス）で測定した。すなわち、[励起光340nmによる500nmの蛍光強度] / [励起光380nmによる500nmの蛍光強度]（細胞内カルシウム濃度を反映）を測定した。

AST(0.2~2単位/mL)、トリプシン(牛の肺臓由来、0.1~1.0単位/mL)、ヒトトロンビン(0.1~1.0単位/mL)、もしくはSFLRNamide(PAR-1、2のアゴニストペプチド)、もしくはSLIGRL(PAR-2のアゴニストペプチド、10~100μM)を添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。その結果、PAR発現用組換えバキュロウ

イルスを感染させた昆虫細胞に特異的にカルシウム流入が観察された。この結果から、機能を有するPARが昆虫細胞に発現していることが証明された。

PAR-1～PAR-4それぞれのCa²⁺流入は以下に示す。

PAR-1は、AST(2単位/mL)、トリプシン(0.1～1.0単位/mL)、トロンビン(0.1～1.0単位/mL)、SFLLRNamide(10～100μM)でCa²⁺流入が認められた。

PAR-2は、AST(2単位/mL)、トリプシン(0.1～1.0単位/mL)、トロンビン(1～1.0単位/mL)、SFLLRNamide(10～100mM)、SLIGRL(10～100μM)でCa²⁺流入が認められた。

PAR-4は、AST(2単位/mL)、トリプシン(0.1～1.0単位/mL)、トロンビン(0.1～1.0単位/mL)でCa²⁺流入が認められた(図12参照)。

[実施例6] 気道上皮細胞を用いたASTによるカルシウム流入実験

(1) 正常ヒト気道上皮細胞を用いたASTによるカルシウム流入実験

3枚の10cmディッシュにコンフルエントになった正常ヒト気道上皮細胞(BioWhittaker社より購入)を用い、ASTによるCa²⁺流入を検討した。10mM EDTA/Hepes-Tyrode緩衝液で10分間かけて細胞を剥がし、室温で800rpm、5分間遠心して細胞を回収し、5mLのHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-)pH7.4に再懸濁した。回収した細胞(約1.2×10⁶細胞)を5mLのHEPES-Tyrode緩衝液(1μg/mL、Fura 2-AM含有)に懸濁し、Fura 2-AMを37℃で1時間負荷した。室温で800rpm、5分間遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-)pH7.4で2回洗浄した後、1.3mLのHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(-)pH7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に5μLの1M CaCl₂を加えて最終濃度1mM CaCl₂になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura 2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100μL/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液-Ca²⁺(+)pH7.4を80μL/ウェルで分注して、Fluorescence Drug Screening System(浜松ホトニクス)で測定した。すなわち[励起光340nmによる500nmの蛍光強度]/

[励起光380 nmによる500 nmの蛍光強度] (細胞内カルシウム濃度を反映) を測定した。

AST (2単位/mL)、牛の脾臓由来トリプシン (1~100単位/mL)、ヒトトロンビン (1~100単位/mL)、SFLRNamide、もしくはSLIGRL (10~100 μM) を添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。

その結果、AST (2単位/mL)、トリプシン (10~100単位/mL)、SFLRNamide (100 μM) で Ca^{2+} 流入が認められた (図13参照)。

(2) 気道上皮細胞株を用いたASTによるカルシウム流入実験

10 気道上皮細胞株BEAS-2BについてのASTによる Ca^{2+} 流入を検討した。6枚の10 cmディッシュにコンフルエントになった細胞を用いた。10 mM EDTA/Hepes-Tyrode緩衝液で10分間かけて細胞を剥がし、室温で1500 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、10 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH 7.4に再懸濁した。回収した細胞 (約1. 1×10^7 細胞) を、11 mLのHEPES-Tyrode緩衝液 (1 μg/mL、Fura 2-AM含有) に懸濁し、Fura 2-AMを37°Cで30分間負荷した。室温で1500 rpm、5分間遠心して細胞を回収し、HEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH 7.4で2回洗浄した後、11 mLのHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (-) pH 7.4に再懸濁した。この細胞懸濁液に1 mMの1 M CaCl_2 を加えて最終濃度1 mM CaCl_2 になるようにし、遮光して室温で5分間インキュベートした。このように調製したFura 2-AM負荷感染細胞を96ウェルプレートに100 μL/ウェルで分注し、さらにHEPES-Tyrode緩衝液- Ca^{2+} (+) pH 7.4を80 μL/ウェルで分注し、Fluorescence Drug Screening System (浜松ホトニクス) で測定した。すなわち [励起光340 nmによる500 nmの蛍光強度] / [励起光380 nmによる500 nmの蛍光強度] (細胞内カルシウム濃度を反映) を測定した。

AST (0.2~2単位/mL)、牛の脾臓由来トリプシン (0.1~100単位/mL)、ヒトトロンビン (0.1~100単位/mL)、もしくはSFLRNamide、SLIGRL (PARアゴニストペプチド、10~100 μM) を添加して刺激を与え、細胞内カルシウム濃度を経時的に測定した。

その結果、AST（2単位/mL）、トリプシン（10～100単位/mL）、SFLRNamide（100μM）でCa²⁺流入が認められた（図14参照）。

[実施例7] HASTによる気道上皮細胞株（BEAS-2B）からのIL-8遊離

5 1) 細胞

BEAS-2B（気道上皮細胞株、ATCCより購入）を用いて試験を実施した。通常の培養はLHC-9（Biophilic社製）を用いて行った。試験に供する際にはLHC-8（ヒドロコルチゾンなし、Biophilic社製）に懸濁して5.0×10⁴ cells/cm²の密度でコラーゲン（Collagen社製）/BSA（ペーリングガーマンハイム社製）/フィブロネクチン（シグマ社製）でコートした96ウェルプレート（Falcon社製）に播きこんだ。24時間培養後、細胞が正常に生着しているのを確認してから薬剤処理を行った。

10 2) 薬剤処理

HAST（100mU/mL）およびTNF-α（R&D社製）（1mg/mL）をLHC-8（ヒドロコルチゾンなし）中で、所定の濃度のベンザミジンもしくはロイペプチドと氷上で30分間反応させた。37℃に加温した後、ウェル中の細胞培養液と全交換して処理を開始した。24時間培養後に培養上清を回収し、IL-8産生の測定を行うまで-80℃で保存した。

15 3) IL-8濃度測定

培養上清中のIL-8濃度は市販の抗体を用いたサンドイッチELISA法により測定した。96ウェルEIA用プレート（Maxi Sorp, Nunc社製）にPBSで1μg/mLに調整したMouse MAb Anti-Human IL-8 Capture（バイオソース社製）を50μL/ウェルで添加し、4℃で一晩放置して抗体を固相化した。250μL/ウェルの洗浄緩衝液（0.05%Tween 20（BioRad社製）含有PBS）で5回洗浄した後、250μL/ウェルのプロッキング緩衝液（1%BSA（ペーリングガーマンハイム社製）、0.05%アジ化ナトリウム含有PBS）を添加し、4℃で一晩放置してプロッキングを行った。250μL/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、プロッキング緩衝液で50倍に希釈した培養上清、もしくはプロッキング緩衝液で調製したIL-8スタンダードを50μL/ウェルで添加し、室温で1時間反応させた。250μL/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、希釈緩衝液（1%BSA、0.

0.5%Tween 20含有PBS)で0.05μg/mLに調整したMouse MAb Anti-Human IL-8 biotin(バイオソース社製)を50μL/ウェルで添加し、室温で1時間反応させた。250μL/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、希釈緩衝液で6000倍に希釈したHRP-ストレプト5アビジン(Genzyme社製)を50μL/ウェルで添加し、15分間反応させた。250μL/ウェルの洗浄緩衝液で5回洗浄した後、TMB Microwell 11ペルオキシダーゼ基質(KPL社製)を100μL/ウェルで添加し、約15分間発色させた。1Mの硫酸を100μL/ウェルで添加し、発色反応を停止させた後、直ちにThermoMaxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices社製)で450nmの吸光度を測定した。各サンプルでの吸光度を、スタンダードの吸光度より作成した標準曲線に回帰させてサンプル中のIL-8濃度を算出した。結果を図8に示す。この結果、プロテアーゼ阻害剤でHASTの活性を抑制することにより、HASTによって惹起される気道上皮細胞からのIL-8遊離が抑制されることが示された。

15

[実施例8] HASTによるIL-8プロモーターの転写活性化IL-8プロモーター領域のクローニング

1) IL-8プロモーター領域のクローニング

ヒトゲノムDNAを鋳型として、フォワードプライマー：IL8-1481；C 20 CCAGATCTGAATTCACTAACCCAGGCATTATTTATC、
フォワードプライマー：IL8-162；AACTTTGGATCCACTCCG
TATTTGATAAGG、リバースプライマー：IL8LUC-R；CATGT
TTACACACAGTGAGAATGGTTCCCTTCCを用いてLA-PCR
(宝酒造社製)によりIL-8のプロモーター領域(Mukaida N. et al., J. Immuno
25 1., 143: 1366-1371, 1989)の約1.5Kb、1.62bpをそれぞれクローニングした。
PCRサイクルは、98℃20秒、58℃1分、68℃5分を25サイクル行なつた。得られた約1.5Kb、約0.25Kbのプロモーター領域のDNAフラグメントをそれぞれIL8-1481、IL8-162と名付けた。

2) IL-8レポータープラスミドの構築

30 pGL3-Basic(Promega社製)ベクターのルシフェラーゼ遺伝子中のATG(翻訳開始コドン)からNarIサイトまでを含むDNAフラグメント

をフォワードプライマー：IL8LUC-F；CTGTGTGTAACATGG
AAGACGCCAAAAACATAAA、リバースプライマー：LUC2087
R；CGGGAGGTAGATGAGATGTGを用いてPCR法により増幅した。

- このルシフェラーゼ遺伝子N末端DNAフラグメントとIL8-1481、IL8
5 -162とをPCR法により連結し、PCRフラグメントIL8-1481-Luc
c(約2Kb)、IL8-162-Luc(約800bp)を得た。これらをBamHIおよびNarIで切断し、それぞれpGL3-BasicのBg1II、Na
rIサイトでルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入し、レポータープラスミドpGL
-IL8-1418、pGL3-IL8-162を構築した。

10 3) 細胞

- BEAS-2B(気道上皮細胞株、ATCCより購入)を用いて試験を実施した。
通常の培養はLHC-9(Biofluid社製)を用いて行った。試験に供する
際にはLHC-8(ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製)に懸濁して 2×10^4 cells/cm²の密度でコラーゲン(Collagen社製)/BS
15 A(ペーリングガーマンハイム社製)/フィプロネクチン(シグマ社製)でコートし
た96ウェルプレート(Falcon社製)に播きこんだ。24時間培養後、細胞
が正常に生着しているのを確認してから一過性の遺伝子導入を行った。

4) 一過性の遺伝子導入

- 一過性の遺伝子導入はLipofectamine PLUS試薬(Gibco
20 社製)を用いて行った。96ウェルプレート中の培養液を50μLの新鮮なLHC
-8(ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製)に置換した。20μLのL
HC-8(ヒドロコルチゾンなし、Biofluid社製)中にコントロールプラ
スミドを0.01μg、レポータープラスミド(pGL3-Basicもしくはp
GL3-IL8-1481もしくはpGL3-IL8-162)を0.09μg、
25 Lipofectamine試薬(Gibco社製)を0.5μLおよびPLUS
試薬(Gibco社製)を0.5μL含有するトランスフェクション培地を1ウェ
ルあたり20μL添加して遺伝子導入を開始した。以降48時間、CO₂インキュ
ベーター内で培養した。

5) 薬剤処理

- 30 遺伝子導入を開始して48時間後に薬剤処理を行った。ウェル中の培養液をHA
ST(300mU/mL)もしくはTNF-α(R&D社製)(1ng/mL)を

含むLHC-8（ヒドロコルチゾンなし、Biological社製）に置換して3時間培養した。後培養液を除去し、細胞を1回PBSで洗浄した後、ルシフェラーゼ活性測定に供した。

6) ルシフェラーゼ活性測定

- 5 ルシフェラーゼ活性はピッカジーンデュアル・シーパンジー（東洋インキ社製）を用いて測定した。HASTもしくはTNF- α で3時間処理した後、培養液を除去し、PBSで1回洗浄し後、20 μ Lの細胞溶解剤を添加して室温で15分間溶解させた。細胞溶解液を1.5mLのマイクロチューブに回収し、4℃で1500回転、10分間遠心して上清をサンプルとして採取した。サンプル20 μ Lを黒色96ウェルプレート（住友ベークライト社製）に添加し、はじめに100 μ Lのピッカジーン発色試薬IIを添加してホタルルシフェラーゼによる発光をルミノメタ（LUMINOUS CT-9000D (DIA-IATRON社製)）で測定した。引き続き100 μ Lのシーパンジー発光試薬を添加し、シーパンジールシフェラーゼによる発光をルミノメタ（LUMINOUS CT-9000D (DIA-IATRON社製)）により測定した。得られたホタルルシフェラーゼ活性をシーパンジールシフェラーゼ活性で除する補正をしてレポーター活性とした（Relative Light Unit (R.L.U.)）とした。さらに各サンプルでのレポーター活性を無刺激群での平均値に対する増加倍率としてデータを解析した。結果を図9に示す。この結果から、HASTは転写レベルでIL-8の産生を亢進させることが明らかとなった。

[実施例9] マウスASTカウンターパートcDNAの取得

(1) マウス気道cDNAの取得

- マウス(C57Black)の気道を採取し、ひとつの気道あたり1mLのIS 25 OGENを使用し、ホモジエナライズを行った。このホモジネートに0.2mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2~3分間放置した。4℃、12000 rpmで10分間遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15000 rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに30 75%エタノールを1mL加え、よく混和した後、4℃、10000 rpmで5分間遠心した。ペレットを風乾し、DNase/RNaseフリーの水に溶解し、一

80°Cで保存した。

マウス気道由来の全RNA 2.5 μgおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScriptTM Preamplication System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製)を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAの合成を行った。

5 (2) マウス気道cDNAからのAST PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびマウスヘプシン(Hepsin)の塩基配列の相同性を比較し、配列番号17、配列番号18で示されるフォワードプライマーおよびリバースプライマーを作成した。このプライマーを使用し、Takara TaqTMポリメラーゼ(宝酒造製)を用い、マウス気道由来cDNAを錆型として添付のプロトコールに従ってPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、目的とする450 bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、マウスHepsinのほかに、ヒトASTと相同性を示す遺伝子がクローニングされていることが明らかとなった。

10 (3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長マウスAST cDNAの取得

15 (2)によって得られた部分塩基配列をもとに5'-RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)および3'-RACE用のプライマーを合成した。1st RACE用のプライマー配列は配列番号19、配列番号20を用い、2nd RACE用のプライマー配列は配列番号21、配列番号22に示す。この配列をもとにMouse 15-day Embryo Marathon-ReadyTM cDNA(Clontech社製、Swiss-Webster/NIH embryo)を用い、5'-RACEおよび3'-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase Mix(Clontech社製)を用い、添付のプロトコールに従って行った。PCR産物をアガロースゲル電気泳動を行った結果、5'-RACEによって約1.1 kbの増幅フラグメントが、3'-RACEによって約0.6 kbの増幅フラグメントが得られた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラ

グメントの塩基配列を決定した。その結果、(2)によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5'一方向、3'一方向にヒトASTと相同性のある塩基配列が伸張されていることが確認された。決定された完全長のマウスAST cDNA配列およびアミノ酸配列を配列番号4に示す。

5 さらに実際にマウス気道において存在するマウスASTが同様のアミノ酸配列であるか否かを確認するため、アミノ酸をコードする遺伝子の外側を認識するPCRプライマー(配列番号23および配列番号24)を合成した。Advantage 2 Polymerase(Clontech社製)を用いてマウス気道cDNAのPCR反応を行い、増幅したDNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、アミノ酸配列が一致することが判明し、気道由来のマウスAST cDNA(配列番号6)のクローニングに成功した。

10 15 (4) ヒトASTとのホモロジーの比較
ヒトASTとマウスASTとのアミノ酸の相同性を比較した結果を図11に示した。相同性比較は遺伝子解析ソフト(Gene Works; テイジンシステムテクノロジー社)を用いて行った。アミノ酸配列は全体で66%一致していた。

[実施例10] げっ歯類ASTカウンターパートcDNAの取得

(1) げっ歯類気道cDNAの合成

20 ハムスター、モルモットの気道を採取し、気道約0.5グラムあたり5mLのI SOGENを使用し、ホモジエナライズを行った。このホモジエネートを3000 rpmで10分間遠心し、上清を1mL採取した。この上清に0.2mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2~3分間放置した。12000 rpmで10分間、4℃で遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15 000 rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに75%エタノールを1mL加え、よく混和した後、10000 rpmで5分間、4℃で遠沈した。ペレットを風乾し、DNase、RNaseフリーの水に溶解し、-80℃で保存した。

30 上記で得られた気道由来のtotal RNA 2.5μgおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplicati on System for First Strand cDNA Synthe

sis Kit (GIBCO-BRL社製) を使用し、添付のプロトコールに従つてcDNAの合成を行った。

(2) cDNAからのAST PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびマウスヘプシン(Hepsin)の塩基配列の相同性を比較し、
5 配列番号17、配列番号18で示されるフォワードプライマーおよびリバースプライマーを作成した。このプライマーを使用し、Takara Taq™ポリメラーゼ(宝酒造製)を用い、気道由来cDNAを錆型として、添付のプロトコールに従つてPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、目的とする450bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガ
10 ロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従つて調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、ヒトASTと相同性を示す遺伝子がクローニングされていることが明らかとなった。

(3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長げっ歯類AST cDNAの取得

15 (2)によって得られた部分塩基配列をもとに5'-RACEおよび3'-RA
CCE用のプライマーを合成した。一方、気道から採取したTotal RNAを1
μg使用して、SMART-RACE Kit (Clontech社製)を用いて
5'-RACE、3'-RACE用cDNAを合成し、5'-RACEおよび3'
-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase
20 Mix (Clontech社製)を用い、添付のプロトコールに従つて行つた。
5'-RACE、3'-RACEによって得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、メインの増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクター(Invitrogen社製)に挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に
25 従つて調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列を決定した。その結果、(2)
によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5'-方向、
3'-方向にヒトASTと相同性のある塩基配列が伸張されていることが確認され
た。決定された完全長のげっ歯類AST cDNA配列およびアミノ酸配列を示す。
モルモット：配列番号36および37、ハムスター：配列番号38および39。

(1) 哺乳類気道cDNAの取得

ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、カニクイザルの気道を採取し、気道約0.5グラムあたり5mLのISOGENを使用し、ホモジエナイスを行った。このホモジエネートを3000rpmで10分間遠心し、上清を1mL採取した。この上清に0.5mLのクロロホルムを加え、ボルテックスで混和し、室温で2~3分間放置した。12000rpmで10分間、4℃で遠心し、上層を新しいチューブに移した。これに0.5mLのイソプロピルアルコールを加え、混合し、室温で10分間放置した。これを15000rpm、4℃で15分間遠心して全RNAを沈殿させた。ペレットに75%エタノールを1mL加え、よく混和した後、10000rpmで5分間、4℃で遠沈した。ペレットを風乾し、DNase、RNaseフリーの水に溶解し、-80℃で保存した。

上記で得られた気道由来のtotal RNA 2.5μgおよびオリゴ(dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScriptTM Preamplicatoin System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製)を使用し、添付のプロトコールに従つてcDNAの合成を行った。

(2) 気道cDNAからのAST PCRフラグメントの取得

ヒトASTおよびげっ歯類ASTの塩基配列の相同性を比較し、ASTS 652F (配列番号40) およびASTS 721F (配列番号41) で示されるフォワードプライマー、ならびにASTS 1166 (配列番号42) およびAST 1211 (配列番号43) で示されるリバースプライマーを作成した。このプライマーを組み合わせて使用し、Pyrobest DNAポリメラーゼ(宝酒造製)を用い、各哺乳類気道由来cDNAを錠型として添付のプロトコールに従つてPCR反応を行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、目的とする475から590bp付近に増幅バンドを認めた。この増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクターに挿入し、大腸菌に形質転換してクローンを得た。プラスミドを定法に従つて調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列決定を行った。その結果、ヒトASTと相同性を示す遺伝子断片がクローニングされていることが明らかとなった。

30 (3) 5'-RACE、3'-RACEによる全長哺乳類AST cDNAの取得
ウサギASTに関しては、(2)によって得られた部分塩基配列をもとに5'-

RACEおよび3'-RACE用のプライマーを合成した。サル、イヌ、ブタ、ウシASTに関しては1st RACE用のプライマー配列は3'-RACE用：配列番号40、5'-RACE用：配列番号43を用い、2nd RACE用のプライマ一配列は3'-RACE用：配列番号41、5'-RACE用：配列番号42を用いた。一方、各哺乳類気道から採取したTotal RNAを1μg使用し、SMART-RACE Kit (Clontech社製) を用いて5'-RACE、3'-RACE用cDNAの合成を行い、5'-RACEおよび3'-RACEを施行した。PCR反応はAdvantage 2 Polymerase Mix (Clontech社製) を用い、添付のプロトコールに従って行った。5'-RACE、3'-RACEによって得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、メインの増幅DNAフラグメントをアガロースゲルより切り出し、TAクローニングベクター (Invitrogen社製) に挿入し、大腸菌に形質転換してそれぞれ数クローンを得た。これらの形質転換体よりプラスミドを定法に従って調製し、挿入DNAフラグメントの塩基配列を決定した。その結果、(2)によって得られた部分塩基配列と一致したシーケンスから始まり、5'ー方向、3'ー方向にヒトASTと相同意のある塩基配列が伸張されていることが確認された。決定された完全長の各哺乳類AST cDNA配列およびアミノ酸配列を示す。ブタ：配列番号26および27、サル：配列番号28および29、イヌ：配列番号30および31、ウシ：配列番号32および33、ウサギ：配列番号34および35。

20

[実施例12] 各種哺乳類ASTの酵素活性測定

(1) 各種哺乳類AST動物細胞発現用プラスミドの作製

各種哺乳類ASTのN末端、C末端をコードする遺伝子配列を基にフォワードプライマー、リバースプライマーを作製し、気道cDNAを鋳型として完全長ASTをコードするcDNAをPyrobest DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) によってPCR増幅した。一方、pcDNA3 (Invitrogen社製) を制限酵素NruIおよびKpnIで切断したものと、ヒトゲノムよりElongation Factor-1α (EF-1α) のプロモーター領域をフォワードプライマー；GACTTCGCGACGTGAGGGCTCCGGTGCCCCGTC、リバースプライマー；GACTGGTACCAAGCTTTCACGACACCTGAAATGGAAGを用いてPCRにより増幅した。増幅フラグメントを制限酵素

Nru I および Kpn I で切断し、上記プラスミドベクターに挿入してヒトEF-1 α のプロモーターを有する pEF9 発現ベクターを構築した。PCR 増幅した AST フラグメントを上記 pEF9 発現ベクターのヒトEF-1 α プロモーターアンダーラインのマルチクローニングサイトに挿入し、各種動物AST 発現プラスミドを作製した。

- 5 塩基配列に関しては自動シーケンサーを用いてシーケンスして確認を行った。

(2) 動物培養細胞における一過性発現による酵素活性評価

ヒト胎児腎臓由来 293 EBNA 細胞 (Invitrogen 社) を 10 cm シャーレで培養し、約 5.8×10^6 cells に対して (1) で作製した各種発現プラスミド 28 μ g を Lipofectamine 2000 (GibcoBRL 社)

- 10 製) 56 μ L を用い、添付のマニュアルに従ってトランسفエクションした。トランسفエクション 3 日後の細胞を 5 mL の M-PER (PIERCE 社製) で可溶化して回収し、AST 活性測定用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 0.01% BSA, pH=8.6) 5 mL を添加したものを細胞溶解物とした。これを AST 活性測定用緩衝液でさらに 10 倍希釈した後、活性測定に供した。合成基質溶液
- 15 (10 mM Boc-Phe-Ser-Arg-MCA の DMSO (ジメチルスルホキシド) 溶液を AST 活性測定用緩衝液にて 50 倍希釈したもの) 20 μ L と上記測定用サンプル 40 μ L とを混合し、1 分間あたりの蛍光強度の上昇を測定し (蛍光波長 460 nm、励起波長 380 nm) 、酵素活性を求めた。結果を次表に示す。

20

	細胞溶解物 蛍光強度比 (ヒトを 100)	Sup 蛍光強度比 (ヒトを 100)
ヒト	100	100
サル	250	150
ブタ	92	
イヌ	40	
ウシ	16	
ウサギ	30	

(3) 哺乳類AST の昆虫細胞発現用組換えバキュロウイルス作製

マウスAST、イヌAST、サルAST に関して、Bac-to-Bac Sy

stem (GIBCO-BRL社製) を用い、添付のプロトコールに従って昆虫細胞発現用組換えBacmidを作製し、Sf9細胞株にトランスフェクションすることにより組換えバキュロウイルスを取得した。

(4) 哺乳類ASTの昆虫細胞発現による大量発現および酵素活性測定

5 昆虫細胞株Tn5を大量培養し、上記組換えバキュロウイルスを感染させた。これを3日間培養することにより組換え哺乳類ASTを発現させ、発現細胞ペレットより実施例1と同様の操作を行って精製組換え哺乳類ASTを取得した。3種のトリプシン様合成基質を用いて切断活性を評価したところ、HAST同様に合成基質: Boc-Phe-Ser-Arg-pNAおよびBoc-Ser-Glu-Gln-Arg-pNA、Boc-Ser-Lys-Gly-Arg-pNAの切断活性をもっており、HAST同様のトリプシン様活性を保持していることが判明した。

[実施例13] AST添加による粘液糖蛋白合成の解析

15 (1) 種々のEGFRリガンドによる粘液糖蛋白の合成

1) 細胞調製

NCI-H292細胞(ヒト肺粘膜表皮腫瘍細胞株、ATCCより購入)を10%FCS(Fetal Calf Serum)含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度でLab-Tek 20 8ウェルチャンバースライド(Nunc社製)に播き、72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

25 処理当日にそれぞれのウェルの培養液をEGF(5ng/mL、ベクトンディックキンソン社製)、HB-EGF(5ng/mL、R&D社製)、TGF- α (5ng/mL、Protech社製)もしくはPBSを含むRPMI-1640(0.1%BSA含有)培地に置換して処理を開始し、24時間、37°Cでインキュベーションした。

3) AB-PAS(Alcian Blue-Periodic Acid/Schiff)染色

30 24時間所定の処理を行った後、培養上清を除去し、PBSで1回洗浄後、4%パラホルムアルデヒド/PBSを添加し、室温で1時間放置して細胞を固定した。

つぎにMilli Q水で2回洗浄後、AB-PAS染色を実施した。染色は成書に従って実施した（「新染色法の全て」p136-150（医薬出版社））。染色後、70、80、100%エタノールに順次5分間ずつ浸漬して脱水し、さらにAcu atex（Merck社製）を用いて封入し、光学顕微鏡で染色像を観察した。結果を次表および図1、図2に示す。この結果より、HAST、TGF- α 、EGF、HB-EGFはいずれも粘液糖蛋白の産生を亢進させることが明らかとなった。

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	-
EGF添加	+++++
HB-EGF添加	+++++
TGF- α 添加	+++++

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	-
HAST添加	+++
HB-EGF添加	++++
TGF- α 添加	++++

10 (2) HASTによる粘液糖蛋白合成とHAST活性阻害効果の検討

1) 細胞調製

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度でLab-Tek 8ウェルチェンバースライド(Nunc社製)に播き、72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

処理当日にそれぞれのウェルの培養液をPBS単独、PBSとロイペプチド(100 μ M、SIGMA社製)、HAST単独(300mU/mL)、HAST(300mU/mL)とロイペプチド(100 μ M)、もしくは99℃で10分間加熱変性させたHAST(300mU/mL)を含むRPMI-1640(0.1% B

S A含有) 培地に置換して処理を開始し、37℃で24時間インキュベーションを行った。

3) AB-PAS染色

- 24時間所定の処理を行った後、培養上清を除去し、PBSで1回洗浄後、4%
 5. パラホルムアルデヒド/PBSを添加し、室温で1時間放置して細胞を固定した。
 つぎにMilliQ水で2回洗浄後、AB-PAS染色を実施した。染色は成書
 に従って実施した(「新染色法の全て」p136-150(医薬出版社))。染色
 後、70、80、100%エタノールに順次5分間ずつ浸漬して脱水し、さらにA
 quatex(Merck社製)を用いて封入し、光学顕微鏡で染色像を観察した。
 10 結果を次表および図3、図4に示す。この結果からプロテアーゼ阻害剤や、加熱処
 理でHASTの活性を阻害することにより、HASTによって惹起される粘液糖蛋白質の產生亢進を抑制できることが示された。

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	-
PBS/ロイペプチん添加	-
HAST添加	+++++
HAST/ロイペプチん添加	-

培養条件	AB-PAS染色強度
PBS添加	-
HAST添加	+++++
加熱変性HAST添加	-

15

[実施例14] AST添加によるMuc5ACのmRNA発現量のリアルタイムPCR法による解析

(1) 阻害剤の濃度依存的なMuc5AC産生上昇阻害の検討

1) 細胞

- 20 NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁して 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播き、72時間培養後に0.1%のBSA

を含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

細胞に添加する前に種々の濃度のロイペプチドと300mU/mLのHASTとを氷上で30分間反応させた。さらに37℃に加温後、ウェルの培養液をHASTもしくはロイペプチドを含む培地と全交換して処理を開始し、24時間処理を行った。対照として99℃で10分間加熱変性させたHAST(300mU/mL)、EGF単独(1ng/mL)、EGF(5ng/mL)とロイペプチド(10^{-5} M)との併用、も同様に処理した。標本数は3で行った。

3) RNA抽出

QIAGEN社のRNasey Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウエルごとに抽出した。それぞれ30μLのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

QIAGEN社のOmni Script-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0.25μgのRNAを用いてcDNA合成反応を行い、それぞれ20μLのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのサンプルとした。

5) TaqMan Assay

EGF処理サンプルを使って連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNA、およびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。βアクチンは市販のプライマーとプローブを用いた(ABI社製)。また、Muc5ACではフォワードプライマーとして、5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3'を、リバースプライマーとして5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3'を、プローブとして5'-ACTCCTTCGTGTTGTCACC-GAGAACGTC-3'を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer Express Ver 1.0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaq Man Universal PCR Mix(ABI社製)を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。增幅反応は、50℃2分、95℃10分処理した後、95℃15秒、60℃1分で、40サイクル行った。

30 6) 解析

Muc5AC、βアクチンとともに得られたC_t値と標準直線より各サンプルでの

発現量を相対比較した。さらに、Muc 5ACの数値を β アクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図5に示す。

この結果から、プロテアーゼ阻害剤や、加熱処理でHASTの活性を阻害することによりHASTによって惹起されるMuc 5ACの遺伝子発現亢進を抑制できることが示された。

(2) 抗EGF-R抗体のMuc 5AC産生上昇阻害の検討

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播き、72時間培養後に0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

2) 薬剤処理

①EGFR中和抗体処理：10 μ g/mLの濃度のEGFR中和抗体(clone LA1、Transduction社製)もしくは対照として10 μ g/mLの濃度のnormal mouse IgG1(R&D社製)で37℃、30分間前処理した後、normal mouse IgG1とHAST(300mU/mL)、EGFR中和抗体とHAST(300mU/mL)、normal mouse IgG1とEGF(1ng/mL)、もしくはEGFR中和抗体とEGF(1ng/mL)を含むRPMI-1640(0.1%BSA含有)に培地を全交換して処理を開始し、24時間処理した。標本数は3で行った。

②ロイペプチド処理：HAST(300mU/mL)とEGF(1ng/mL)を氷上でロイペプチド(10^{-4} M)で30分間前処理し、37℃に加温した後、ウェル中の培地と全交換し処理を開始し、24時間処理した。標本数は3で行った。

25 3) RNA抽出

QIAGEN社のRNeasy Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウエルごとに抽出した。それぞれ30 μ LのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

QIAGEN社のOmni Script-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0.25 μ gのRNAを用いてcDNA合成反応を行い、それぞれ20 μ LのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのサン

プルとした。

5) TaqMan Assay

EGF処理サンプルを用い、連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNAおよびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。 β アクチンは市販のプライマーとプローブを用いた(ABI社製)。また、Muc5ACではフォワードプライマーとして、5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3'を、リバースプライマーとして5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3'を、プローブとして5'-ACTCCTTCGTGTTGTCACCGAGAACGTC-3'を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer Express Ver 1.0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaqMan Universal PCR Mix(ABI社製)を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。增幅反応は、50°C 2分、95°C 10分処理した後、95°C 15秒、60°C 1分で、40サイクル行った。

15 6) 解析

Muc5AC、 β アクチンとともに得られたCt値と標準直線より各サンプルでの発現量を相対比較した。さらに、Muc5ACの数値を β アクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図6に示した。

20 この結果から、プロテアーゼ阻害剤や加熱処理でHASTの活性を阻害することにより、HASTによって惹起されるMuc5ACの遺伝子発現の亢進を抑制できることが示された。さらに、HASTがEGFRを介してMuc5AC遺伝子発現を亢進させていることが示された。

(3) トリプシン、エラスター、トリプターゼとの比較

25 1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10%FCS含有RPMI-1640(Gibco社製)に懸濁し、 6.0×10^4 cells/cm²の密度で96ウェルプレート(Falcon社製)に播いて72時間培養後、0.1%のBSAを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

30 2) 薬剤処理

処理当日にウェルの培養液をHAST(0.3U/mL)、エラスター(0.

1、1、10 U/mL)、トリプシン(0.1、1、10 U/mL)およびトリプターゼ(0.1、1、10 U/mL)を含むRPMI-1640(0.1%、BSA含有)に交換し、24時間処理した。

3) RNA抽出

5 QIAGEN社のRNasey Mini KitとRNase-free DNaseを用いて各ウエルごとに抽出した。それぞれ30 μLのRNA溶液を得た。

4) cDNA合成

QIAGEN社のOmni Script-RTを使用した。ランダムプライマーを使い、0.25 μgのRNAを用いて、cDNA合成反応を行い、それぞれ20 μLのcDNA溶液を得た。一部を水で5倍希釈し、TaqMan Assayのsampleとした。

5) TaqMan Assay

EGF処理サンプルを使って連続5倍希釈でスタンダードを調製した。5倍希釈したcDNA、およびスタンダードを鋳型としてPCRを行った。 β アクチンは市販のプライマーとプローブを用いた(ABI社製)。また、Muc5ACではフォワードプライマーとして、5'-TCAACGGAGACTGCGAGTACAC-3'を、リバースプライマーとして5'-TCTTGATGGCCTTGGAGCA-3'を、プローブとして5'-ACTCCTTCGTGTTGTCACC GAGAACGTC-3'を用いた。プライマーおよびプローブはPrimer Express Ver 1.0を用いてデザインした。プライマーはファルマシア社に外注して合成し、プローブはABI社に外注して合成した。PCRはTaq Man Universal PCR Mix(ABI社製)を用いてGeneAmp 5700により手順書に従って行った。增幅反応は、5.0°C 2分、95°C 10分処理した後、95°C 15秒、60°C 1分で、40サイクル行った。

25 6) 解析

Muc5AC、 β アクチンとともに得られたCt値と標準直線より各サンプルでの発現量を相対比較した。さらに、Muc5ACの数値を β アクチンの数値で除して補正した。最終的にそれぞれ処理サンプルでの値を無処理群での平均値で除して、増加倍率としてデータ表示した。結果を図7に示す。

30 この結果よりHASTはトリプシン、トリプターゼ、およびエラスターーゼにはない特異的な機序によってMuc5AC遺伝子発現を亢進させていることが明らかと

なった。

[実施例15] HASTによる細胞膜表面上のEGF-L(EGFおよびHB-EGF)の切断

5 (1) HASTによるH292細胞膜表面上のEGFおよびHB-EGF抗原の切断

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10cmディッシュを用い、10%FCS含有RPMI-1640中でコンフルエントになるまで培養した後、培地を0.1%BSA含有RPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。

10 PBSで洗浄後、5mMのEDTAを含有するPBS中、37℃で5分間処理して浮遊させた後、0.1%BSA含有RPMI-1640に 1.0×10^7 cells/mLの密度で懸濁させた。

2) 薬剤処理

15 2倍濃度のHAST(600mU/mL)を含む0.1%BSA含有RPMI-1640と上述した細胞懸濁液とを等量混合し、37℃で30分間反応させた(終濃度:細胞は 5.0×10^6 cells/mL、HASTは300mU/mL)。氷冷した1%FCS含有PBSを反応液量の5倍量添加して反応を停止させた後、表面抗原解析に供した。

3) 表面抗原解析

20 所定の処理を行った細胞を 1.0×10^7 cells/mLの密度で1%FCS含有PBSに懸濁した。調製した細胞懸濁液 $100\mu L$ に一次抗体(EGFのバックグラウンド染色:nor mal mouse IgG1(R&D社製)を $1\mu g$ 、EGF染色:抗EGFマウスモノクローナル抗体(R&D社製)を $1\mu g$ 、HB-EGFバックグラウンド染色:一次抗体は添加しない、HB-EGF染色:抗HB-EGFヤギポリクローナル抗体(R&D社製)を $2\mu g$)を添加して氷上で30分間反応させた。 $5mL$ の1%FCS含有PBSで一回洗浄した後、2次抗体(EGFバックグラウンド染色およびEGF染色:FITC conjugated F(ab')₂ fragment to mouse IgG(Dako社製)、HB-EGFバックグラウンド染色およびHB-EGF染色:Swine Anti Goat Ig's Fluorescein Conjugate(KPL社製))を $2\mu g$ 添加し、さらに氷上で30分間反応させた。 $5mL$ の1%FCS

含有PBSで1回洗浄した後、Cell Fix（ベクトン ディッキンソン社製）を添加して細胞を固定した。表面抗原の発現はFACS Calibur（ベクトン ディッキンソン社製）を用いて測定し、Cell Quest（ベクトン ディッキンソン社製）により解析した。発現強度の指標として平均蛍光強度を次
5 表に示した。

この結果より、HASTが細胞膜表面上のproEGFおよびproHB-EGFを切断させることが示された。

HAST処理による細胞膜表面上のEGF, HB-EGF発現強度の変化

	バックグラウンド	PBS	HAST
EGF	4. 62	7. 26	4. 88
HB-EGF	4. 5	8. 72	6. 94

10

(2) AST活性阻害効果の検討

1) 細胞

NCI-H292細胞(ATCCより購入)を10cmディッシュを用い、10%FCS含有RPMI-1640中でコンフルエントになるまで培養させた後、
15 培地を0.1%BSA含有RPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。
PBSで洗浄後、5mMのEDTAを含有するPBS中で37℃で5分間処理して浮遊させた後、0.1%BSA含有RPMI-1640に 1.0×10^7 cells/mLの密度で懸濁させた。

2) 薬剤処理
20 HAST(600mU/mL)とロイペプチド(10μM)もしくはBB1101(5μM)を0.1%BSA含有RPMI-1640中、氷上で30分間反応させた後、あらかじめロイペプチド(10μM)もしくはBB1101(5μM)でそれぞれ37℃、30分間前処理した細胞懸濁液に等量添加し、さらに37℃で30分間処理した(終濃度:HASTは300mU/mL、ロイペプチドは10μM、
25 BB1101は5μM、細胞は 5.0×10^6 cells/mL)。氷冷した1%FCS含有PBSを反応液量の5倍量添加して反応を停止させた後、表面抗原解析に供した。

3) 表面抗原解析

所定の処理を行った細胞を 1.0×10^7 cells/mLの密度で1%FCS含有PBSに懸濁した。調製した細胞懸濁液 $100\mu\text{L}$ に一次抗体(EGFのバックグラウンド染色: normal mouse IgG1 (R&D社製) を $1\mu\text{g}$ 、 EGF染色: 抗EGFマウスモノクローナル抗体 (R&D社製) を $1\mu\text{g}$ 、 HB-EGFバックグラウンド染色: 抗HB-EGFヤギポリクローナル抗体 (R&D社製) を $2\mu\text{g}$)を添加して氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS含有PBSで1回洗浄した後、2次抗体(EGFバックグラウンド染色およびEGF染色: PerCP conjugated F(ab')₂ fragment to mouse IgG (ベクトンディッキンソン社製)、もしくはSwine Anti Goat Ig's Fluorescein Conjugateを $2\mu\text{g}$ 添加し、さらに氷上で30分間反応させた。5mLの1%FCS含有PBSで1回洗浄した後、Cell Fix (ベクトンディッキンソン社製)を添加して細胞を固定した。表面抗原の発現はFACSCalibur (ベクトンディッキンソン社製)を用いて測定し、Cell Quest (ベクトンディッキンソン社製)により解析した。発現強度の指標として平均蛍光強度を次表に示した。

この結果により、プロテアーゼ阻害剤でHASTの活性を抑制することにより、HASTによって惹起される細胞膜表面上のproEGFおよびproHB-EGFの切断が抑制されることが示された。

20

HAST処理による細胞膜表面上のEGF, HB-EGF発現強度の変化

	バックグラウンド	PBS	HAST	HAST+ロイペプチド	HAST+BB01
EGF	8.44	10.79	8.33	10.18	7.49
HB-EGF	5.58	8.61	6.26	7.3	6.65

(3) HASTによるEGF-L(ヒトHBEGF)の切り出し評価

1) ヒトHBEGF動物細胞発現プラスミド作製
25 ヒト気道PolyA⁺RNA (Clontech社製) $2.5\mu\text{g}$ およびオリゴ

- (dT)₁₂₋₁₈を用い、SuperScript™ Preamplicat ion System for First Strand cDNA Synthesis Kit (GIBCO-BRL社製) を使用し、添付のプロトコールに従ってcDNAを合成した。作製したヒト気道cDNAを鑄型としてヒトHB-EGFのN末端のシグナルペプチドからJaxtamembrane Domainを含んだ領域をコードするcDNAフラグメントをPyrobest PCR (宝酒造社製) により増幅して取得した。一方、ヒト胎盤アルカリフェオスマーカーcDNAをpSEAP2-Controlベクター (Clontech社製) よりPyrobest PCRにて増幅して取得した。
- Jaxtamembrane DomainのC末端にヒト胎盤アルカリフェオスマーカーを付加したDNAフラグメント：HBEGF (△TM)-ALP (配列番号44) は、ヒトHB-EGFのN末端のシグナルペプチドからJaxtamembrane Domainを含んだ領域をコードするDNAフラグメントと、ヒト胎盤アルカリフェオスマーカーをコードするDNAフラグメントをPCR法にて連結して作製した。
- 実施例12(1)で作製したpEF9ベクターのマルチクローニングサイトに、上記のHBEGFを挿入することにより、ヒトHBEGF発現プラスミド：pEF9-HBEGF (△TM)-ALPを作製した。
- 2) ヒト培養細胞におけるHBEGFの発現
- 293EBNA細胞株を 9×10^6 cells/10cmディッシュで播いて一晩培養し、1)で作製したヒトHBEGF発現プラスミド：pEF9-HBEGF (△TM)-ALPをトランスフェクションした。12μgのpEF9-HBEGF (△TM)-ALPを75μLのLipofectamine 2000 (GIBCO-BRL) でリポフェクションした。リポフェクションは添付のマニュアルに従って行った。72時間後の細胞をピペッティングで剥がし、3000 rpm、4℃で5分間遠心分離した。そのライセートを12mLのM-PER (PIERC E社製) で可溶化し、非還元条件下でSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜 (BIO-RAD社) にプロッティングした。
- 3%BSAを含むPBSを用いて4℃で一晩処理後、1%BSAを含むPBSで1μg/mLに希釈した抗ヒトHB-EGF抗体 (GENZYME社、EGFRと結合する部分を認識する抗体) と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を

0. 05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、1% BSAを含むPBSで
1 μg/mLに希釈したSwine Anti-Goat Ig's-ALP抗体
(BIOSOURCE社)と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を0.
05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、TBSで1回洗浄してNBT
5 (ニトロブルー・テトラゾリウムクロリド) /BCIP (5-ブロモ-4-クロロ
-3-インドリルホスフェート p-トルイジン塩、PIERCE社)により室温
で5分間反応させて発色させた。
- 3) HASTによるHB-EGF (△TM)-ALPの切断活性
M-PERで可溶化した100 μLのライセートに10 μLの組換えHAST
10 (1. 56 U/mL) を加えて37°Cで一晩インキュベーションした。そのサンプ
ルを上記と同様にウエスタンプロテイングした。その結果、HAST添加のサンプ
ルでは抗ヒトHB-EGF抗体 (EGFRと結合する部分を認識する抗体) に反応
性を示すバンドが低分子量にシフトし、HB-EGFのEGFドメインを有する成
熟型が切り出され、約12 kDの位置にバンドがシフトしていることが確認された。
15
- [実施例16] HASTによるEGFRのチロシンリン酸化解析
- 1) 細胞
NCI-H292細胞 (ATCCより購入) を10% FCS含有RPMI-16
40 (Gibco社製) に懸濁して 6.0×10^4 cells/cm²の密度で12
20 ウエルプレート (Falcon社製) に播いた。72時間培養後、0.1%のBS
Aを含むRPMI-1640に置換し、さらに24時間培養した。
- 2) 薬剤処理
処理当日にウェルの培養液をHAST (0.3 U/mL)、EGF (1 μg/mL)
を含むRPMI-1640 (0.1% BSA含有) に交換して30、60、
25 120、180、240分間の処理を行った。
- 3) 細胞溶解物の調製
所定の時間HASTもしくはEGFで処理した細胞を氷冷したPBSで2回洗浄
した後、氷冷したLysis緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5
mM EDTA, 1% Triton X-100 (Sigma), 150 mM Na
30 C1, 10%グリセロール、1% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), 1% Phosphatase Inhibitor

Cocktail (Sigma)) を 500 μL 添加して 15 分間氷上で放置した後、マイクロチューブに回収した。4°Cで 15000 回転、10 分間遠心した後、上清をサンプルとして回収した。サンプルの蛋白質濃度は Bio Rad Protein Assay (Bio Rad 社製) により測定し、すべてのサンプル中の蛋白質濃度が 1.48 mg/mL になるように、適宜 Lysis 緩衝液で希釈した後、406 μL を以降の免疫沈降に用いた。

5 4) 免疫沈降

上述したように調整した細胞溶解物 (1.48 mg/mL, 406 μL) に 8 μL の agarose conjugated mouse IgG1 (サンタクルズ社製)、および 20 μL の Protein G Plus Agarose (Oncogene 社製) を添加し、4°Cで 2 時間穏やかに攪拌した。4°Cで 3000 回転、1 分間遠心した後、上清を回収し、4 μg の抗 EGFR 抗体 (Clone LA1, Transduction 社製) を添加して 4°Cで 1 時間穏やかに攪拌した。さらに 20 μL の Protein G Plus Agarose (Oncogene 社製) を添加して 4°Cで一晩穏やかに攪拌した。これを 4°Cで 3000 回転、1 分間遠心した。上清を捨てた後、沈降物を 1 mL の氷冷した洗浄緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (Bio Rad)) で 4 回洗浄した後、Tween-20 を含まない洗浄緩衝液で一回洗浄した。4°Cで 3000 回転、1 分間遠心した後、上清を除去し、沈降物に 25 μL の SDS サンプル緩衝液 (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% グリセロール、0.04% プロモフェノールブルー、4% 2-メルカプトエタノール) を添加し、99°Cで 5 分間過熱した。室温で 3000 回転、1 分間遠心した後、上清を回収し、ウエスタンプロッティングのサンプルとした。

25 5) ウエスタンプロッティング

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した蛋白質をセミドライトランスファー (アトー社製) を用いてナイロンメンプラン (Immobilion PVDF membrane, Millipore 社製) へ転写した。プロッキング緩衝液 (1% BSA (ペーリングガーマンハイム社製) を含む洗浄緩衝液) 中で、4°C で一晩プロッキングした。その後、プロッキング緩衝液で 2500 倍に希釈した HRP-抗ホスホチロシン抗体と室温で 1 時間反応させ、メンプランを洗浄緩衝液で

6回洗浄し、発色させた。

6) 発色、検出

ECL plus (Amasharm Pharmacia Biotech社製) を用いた。洗浄後のメンプランをECL発色液中に室温で5分間浸漬した。メンプランより余剰の発色液を除いた後、サランラップ中に密封し、X線フィルムに2分～5分程度露光させた後、現像してチロシンリン酸化された蛋白質のバンドを解析した。

7) リプロービング

X線フィルムに露光後、メンプランを洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄した。次に Restore試薬 (PIERCE社製) 中、37℃で15分間振とうして、抗体を除いた。洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄した後、ECL plus を用いて、上述した方法にて発色させ、10分間X線フィルムに露光させた。X線フィルムを現像し、何らバンドが残存していないことを確認した後、メンプランを洗浄緩衝液で5分間、3回洗浄し、さらにブロッキング緩衝液に浸漬し、4℃で一晩放置してブロッキングした。次に、ブロッキング緩衝液で0.1 μg/mLに希釈した抗EGFR抗体 (Clone 13 Transduction社製) 中、室温で1時間反応させた。洗浄緩衝液で6回洗浄した後、ブロッキング緩衝液で6000倍に希釈したHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製) 中、室温で1時間反応させた。洗浄緩衝液中で6回洗浄した後、ECL plus を用いて、上述した方法に従って発色させ、EGFRのバンドを検出した。結果を図10に示す。

HASTはEGFRのチロシンリン酸化を亢進させたことより、EGFRを活性化させることが明らかとなった。

[実施例17] 抗ASTポリクローナル抗体の取得

25 (1) 抗ペプチド抗体の取得

ヒトASTの187番目イソロイシンから205番目の残基までの、N末端にシスティンを有する20残基のペプチド (配列番号25) をペプチドシンセサイザー (Applide Biosystems Model 431A) にて化学合成した。この合成ペプチドを10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し (10mg/mL) 、10mgのマレイミド活性化ヘモシアニン (Boehringer Mannheim Biochemical社製) と25℃で2時間インキュベート

した後、反応溶液を10 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)に対して透析した。ヘモシアニンに結合させたペプチドを家兎の皮下に投与した(0.5 mg/1回)。投与は2週間おきに6回繰り返した。全血を採取し、血清を調製した後、プロテインAセファロース4Bカラム(ファルマシア社製)で精製して抗ASTポリクローナル抗体(anti-N19 PAb)を得た。

5 (2) 抗組換えAST抗体の取得

実施例1で調製した組換えAST(40 μg/1回)をフロイントのコンプリートアジュvant(BACTO社製、1:1)とともに、2週間毎に家兎に皮内投与した。これを4回行なった後、全採血をして抗血清を得た。この血清から常法に従10い、プロテインAセファロース4Bカラム(ファルマシア社製)にてIgGを精製し、抗ASTポリクローナル抗体(anti-rAST PAb)を得た。

[実施例18] 抗ASTモノクローナル抗体の作製

(1) 組換えASTによるマウスの免疫

15 実施例1で調製した組換えASTをフロイントのコンプリートアジュvant(BACTO社製、1:1)とともに、2週間毎にBalb/cマウス(7週齢、オス)に腹腔内投与した(10-20 μg/回/head)。これを4回行なった後、5回目は細胞融合の3日前に組換えAST溶液50 μgを静脈内投与した。マウスの尾静脈より採血し、37°Cで30分間インキュベート後、3000 rpmで10分間遠心して血清を回収し、血清中の抗AST抗体価をELISAにより測定した。

20 以下、その方法を述べる。

96穴ELISAプレート(Falcon 3912、Becton Dickinson社)に0.05M Na₂CO₃緩衝液(pH 10.5)で1 μg/mLに希釈した組換えASTを50 μL加え、4°Cで1晩反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、室温にて3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSで1時間処理した。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、検体を50 μL加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、3% BSAを含むPBSで1000倍希釈したアルカリホスファターゼと結合させたヤギ抗マウスIgG抗体(ZYMED社)を50 μL加え、室温で1時間反応させた。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、PNPP(p-nitrophenylphosphate、和光純薬)

と室温で1時間反応させ、405 nmにおける吸光度を測定した。

(2) 細胞融合によるハイブリドーマの作製

細胞融合の直前にマウスを殺し、脾細胞をPBS中でホモジナイズし、残渣をナイロンメッシュで濾過後、PBSで遠心洗浄を1回行なった。この脾細胞とマウス

5 ミエローマ (P3X63Ag8U. 1) とを常法 (Kohler, Milstein; Nature, 256, 495-497, 1975) に従って細胞融合した。

すなわち、脾細胞 5×10^7 個とマウスマエローマ細胞 P3X63Ag8U. 1

(P3U1) 5×10^6 個を RPMI 1640培地で洗浄後、1500 rpmで5分間遠心し、細胞ペレットにした。35%ポリエチレングリコール液 (RPMI 1

10 640培地 5. 75 mL + ポリエチレングリコール 3. 5 mL + ジメチルスルホキシド 0. 75 mL) を2分間で 1 mL 加え、細胞をゆるやかに浮遊させた。RPMI 1640培地を2分間で 1 mL 加えた後、さらに2分間で 2 mL 加えた。次に GIT-HAT培地 ($95 \mu M$ ヒポキサンチン、 $0.4 \mu M$ アミノブテリン、 $1.6 \mu M$ チミジン、および 5% FCS を含む GIT 培地) を2分間で 4 mL 加えた

15 後、さらに2分間で 8 mL 加えた。37°Cで30分間インキュベート後、各ウェルあたり約 10^4 個のマウスマニトウ腹腔浸出細胞を播きこんだ 96 穴平底プレート 1 枚に分注し、5% CO₂ 存在下、37°Cで培養した。

1週間後に GIT-HAT 培地 (GIT-HAT 培地よりアミノブテリンを除いた培地) で培地を半量交換し、さらに 5% CO₂ 存在下、37°Cで約1週間培養することにより各ウェルあたり数個のハイブリドーマのコロニーを得た。

(3) ハイブリドーマのスクリーニング

2週間後に組換えASTをコートしたプレートによるスクリーニングを行なった。

組換えASTの 5.0 mM Na₂CO₃ 緩衝液溶液 ($1 \mu g/mL$, pH 10. 5)

を 96 ウエルプレート (Falcon 社, PVC 製) に各ウェル当り 50 μL ずつ

25 分注し、4°Cで1晩放置した。洗浄後、3% BSA/PBS を各ウェル当り 200 μL 加え、37°Cで1時間プロッキングした。再度洗浄後、各ウェル当り 50 μL の培養上清を加え、室温で1時間放置し、0.05% Tween/PBS で3回洗浄した。

次に、3% BSA および 0.2% スキムミルクを含む PBS で 2000 倍に希釈したやぎ抗マウス IgG-アルカリホスファターゼコンジュゲート (Tago 社) をウェル当り 50 μL 加え、室温で1時間放置した。再度洗浄し、0.25 m

Mの塩化マグネシウムを含む1Mジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解したp-ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム塩(和光純薬)の1mg/mL溶液をウェル当り100μL加え、室温で30分間反応させた。その405nmにおける吸光度を96ウェルプレート用のELISAリーダー測定器(Molecular Devices社Vmax)を用いて調べ、組換えASTと結合するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択した。

(4) ハイブリドーマのクローニング
このように選択したハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを2回行ない、株化した。具体的にはマウス腹腔浸出細胞をHT培地中 10^6 個/mLの割合に調製したものを各ウェルに分注し、これにウェル当り0.5個の割合でHT培地に懸濁したハイブリドーマ細胞を播き込み、5%CO₂存在下、37℃で2週間培養した。その培養上清について上記ELISA法でスクリーニングし、単一コロニーをピックアップすることで株化を行なった。

(5) ハイブリドーマの培養および抗体精製
以上の操作で得られた抗AST抗体を产生するハイブリドーマ20クローンのうち6クローンをインシュリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレナイトを含む無血清培地であるeRDF培地(Gibco BRL社)に適応させて培養し、培養上清を回収した。培養上清中の抗体をプロテインGカラムで常法により精製した。

(6) ASTモノクローナル抗体のサブタイピング

(5) の操作で得られた精製抗ASTモノクローナル抗体6クローンに関し、Isotype Strip(マウスモノクローナル抗体のアイソタイピングキット、ベーリンガー社製)を用い、プロトコールに従ってサブタイピングを行った。その結果、3クローンがIgG1であり、2クローンがIgMであることが判明した。

[実施例19] 抗AST抗体によるウエスタンプロッティング

組換えASTもしくは天然ASTを還元条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、ニトロセルロース膜(BIORAD社)にウエスタンプロッティングした。3%BSAを含むPBSで室温で1晩処理後、3%BSAを含むPBSで10μg/mLに希釈した実施例17、18で得られた抗AST抗体と室温で1時間反応させた。ニトロセルロース膜を1%BSAを含むPBSで6回洗浄

後、3% BSAを含むPBSで $25\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したアルカリホスファターゼと結合させたヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO社)と室温で1時間反応させた。二トロセルロース膜を1% BSAを含むPBSで6回洗浄後、NBT/BICP(PIERCE社)で室温で10分間反応させ、発色させた。

- 5 これにより、それぞれの抗AST抗体が組換えASTと結合することが示された。
ウエスタンプロッティングの反応性は、ポリクローナル抗体ではanti-N-1-9
PAbの反応性が高く、anti-rAST PAbは反応性が低かった。また、
anti-rAST PAbはマストセル由来トリプターゼおよびトリプシンとは
交差反応性を示さなかった。なお、ネガティブコントロールとしては正常ウサギI
10 gGを使用した。

[実施例20] AST阻害活性の評価

(1) AST活性の測定方法

- 測定方法、活性単位の定義は上記実施例2において示した通りである。
15 (2) 抗AST抗体のAST阻害活性の評価
組換えASTを $2\text{ng}/\text{mL}$ 、BSAを0.01%含有する 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.6)0.5mLに対し、抗AST抗体含有溶液を $50\mu\text{L}$ 加え、37℃で30分間インキュベートした。その後、トリプシン用合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCAを $200\mu\text{M}$ 含有する 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.6)0.5mLを加え、37℃で1時間インキュベートした。
20 次いで1mLの30%酢酸を加え、生成したAMC量を蛍光測定により測定し(蛍光460nm、励起光380nm)、抗AST抗体の酵素活性阻害能を評価した。
結果を図15に示す。

- 実施例において取得した組換えAST(昆虫細胞-バキュロウイルス系)を免疫して得られた抗ASTポリクローナル抗体に、 $236\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で27%の活性阻害効果が認められた。

(3) 化合物のAST阻害活性の評価

- 組換えASTを $2\text{ng}/\text{mL}$ 、Tween20を0.01%含有する 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.6)0.05mLに対し、評価対象化合物として各種濃度のメシル酸ナフアモスタッフまたはメシル酸ガベキサート含有DMSO溶液を $2\mu\text{L}$ 、およびトリプシン用合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MC

Aを30μM含有する50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.6)0.05mLを加え、24℃で6分間インキュベートした。経時的に生成したAMC量を蛍光測定により測定し(蛍光460nm、励起光380nm)、化合物の酵素活性阻害能を評価した。結果をIC50(50%の阻害活性を示すモル濃度)として次表に示す。

化合物名称	IC50 (μM)
メシル酸ナファモstatt	0.23
メシル酸ガベキサート	0.14

[実施例21] AST測定系の構築

10 (1) ポリクローナル抗体によるサンドイッチELISA系の構築

実施例17で得られた抗ASTポリクローナル抗体(anti-rASTPA)

b) を用いて以下の操作を行ない、サンドイッチELISA系を構築した。

1) ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)標識抗体の調製

①抗体($F(ab')_2$)の調製

15 抗体(IgG)の2.0mg/mLのPBS溶液1mLに1Mの酢酸緩衝液(pH4.2)100μLと、40μgのペプシンを20μLの同緩衝液に溶解して加え、37℃で4時間反応させた。反応終了後、PBSにて平衡化したセファデックスG25カラム(Φ2cm×45cm)を用いて分離し、抗体($F(ab')_2$)を採取した。

20 ②抗体($F(ab')_2$)のHRP標識

抗体($F(ab')_2$)の1mg/mL、0.01Mリン酸、0.15MNaCl(pH7.4)溶液2mLに、N-(m-マレイミド安息香酸)-N-サクシニミドエステル(MBS)のジメチルホルムアミド溶液(10mg/mL)50μLを添加し、25℃で30分間反応させた。次いでセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)でゲルfiltrationを行ない、マレイミド化抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、HRPの10mg/mLの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)溶液2mLにS-アセチルメルカプト無水コハク酸の60mg/mLジメチルホルムアミド

溶液 $120\mu\text{L}$ を加え、 25°C で2時間反応させた。次に $0.1\text{M}\text{Tris-HCl}$ 緩衝液(pH7.0)を $800\mu\text{L}$ 、 0.1M EDTA を $160\mu\text{L}$ 、 $1\text{M}\text{ヒドロキシルアミン}1.6\text{mL}$ を加え、 0°C で4分間反応させた。その後、反応液をコロジオンパックに入れ、 $0.1\text{M}\text{リン酸緩衝液(pH6.0)}$ 、 5mM EDTA 含有溶液を用いて 4°C で3日間透析し、チオール化HRPを得た。

次に、マレイミド化抗体 2mg とチオール化HRP 4mg とを混合し、コロジオンパックを用いて氷冷下に $4\sim10\text{mg/mL}$ の蛋白濃度になるまで濃縮し、 $15\sim20^\circ\text{C}$ で一夜放置した。その液をウルトロゲルAcA44(ファルマシアLKB社製)を充填したカラムでゲルfiltrationし、抗AST(F(ab')_2)HRP標識抗体を得た。

10. 得た。

2) 抗体固定化プレートの調製

96ウェルプレート(住友ベークライト社製、MS-3796F/カルボプレート)をよく洗浄し、抗体の $20\mu\text{g/mL PBS}$ 溶液中に 4°C で一昼夜放置した。これをPBSで洗浄し、 1% 牛血清アルブミン(BSA)のPBS溶液中、 4°C で1昼夜放置することでポストコーティング処理を行い、抗体固定化プレートを得た。

3) 測定系の構成

2)で調製した抗AST抗体IgG固定化プレートに、精製した組換えAST(標準物質)を $0\sim1600\text{ng/mL}$ の範囲で含有する $1\%\text{BSA}-0.1\%$ スキムミルク含有 10mM PBS(pH7.2) 溶液(検体希釈液) $100\mu\text{L}$ を添加し、 25°C で4時間インキュベートした。その後、 $0.05\%\text{Tween20}$ 含有 10mM PBS(pH7.2) により洗浄し、1)で作成した抗AST(F(ab')_2)HRP標識抗体($500\mu\text{g/mL}$)の $1\%\text{BSA}$ 含有 10mM PBS(pH7.2) 100倍希釈溶液を $100\mu\text{L}$ ずつそれぞれのウェルに添加し、 25°C で2時間インキュベートした。次に各ウェル内の溶液を吸引除去した後、 $0.05\%\text{Tween20}$ 含有 10mM PBS(pH7.2) により洗浄し、3', 5', 5'-テトラメチルベンジン塩酸塩 $0.02\%, \text{H}_2\text{O}_2 2.5\text{mM}$ を含有する $0.1\text{M}\text{リン酸/クエン酸緩衝液(pH4.3)}$ を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに加えた。 25°C で30分間反応させた後、反応停止剤として $0.5\text{M}\text{硫酸水溶液}$ を $100\mu\text{L}$ ずつ加え、酵素反応を停止させた。次にこの溶液について分光光度計を用いて 450nm の波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度 $0\sim1600\text{ng/mL}$ に対応してプロットした。結果を図16に示す。

4) 生体内成分中のASTの検出

①唾液中のASTの検出

- 3) の測定系を用いてヒト唾液中のASTを測定した。ヒトから採取した唾液を15000 rpmで15分間遠心した上清を測定サンプルとした。6検体について、
- 5 原液のままと1%BSA-0.1%スキムミルク含有10mM PBS (pH7.2) 溶液(検体希釈液)で16倍に希釈したものについて測定した。3検体に関しては測定値が低いため原液の値を採用し、他の3検体については16倍希釈の値を採用して唾液中のAST濃度とした。測定結果を検体中のAST活性(トリプシン基質分解活性)とともに次表に示す。

10

	AST (ng/mL)	
唾液検体	ELISA	AST 活性換算*
KM123	1616	3333
KY123	24	120
KT123	22	518
HO123	720	1772
KY112	25	208
HO112	784	2349

*組換えHAT換算トリプシン様酵素活性

②喀痰中のASTの検出

- 喀痰を慢性気道炎症患者より採取し、9倍量の生理食塩水にて希釈した後、ホモジエナライズし、10000×gで10分間遠心した上清を測定検体とした。検体を15 20倍希釈して測定を行った結果を図17に示す。膿性痰のほうが粘液性痰より低い測定値を示した。

ここで、粘液性-粘液膿性痰は以下の患者より採取した。

CB; 慢性気管支炎

Sec CB; 繰発性気管支炎

BA; 気管支喘息

20

B E ; 気管支拡張症

D P B ; びまん性汎細気管支炎

また、膿性痰は以下の患者より採取した。

B E ; 気管支拡張症

5 D P B ; びまん性汎細気管支炎

(2) モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体によるサンドイッチELI

S A 系の構築

1) 各抗ASTモノクローナル抗体の液相抗原反応性の評価

サブタイピングにより IgG1 タイプであった 3 種の抗ASTモノクローナル抗体に関して、液相中の組換えASTに対する結合性の評価を行った。

96 ウエルプレートに各抗ASTモノクローナル抗体の PBS 液（1 および 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）をウェルあたり 50 μL 加え、4°Cで一晩静置してプレートに抗体を固定化した。調製した抗ASTモノクローナル抗体固定化プレートに、精製した組換えAST（標準物質）を 0 ~ 300 ng/mL の範囲で含有する 1% BSA - 0.

15 1% スキムミルク含有 10 mM PBS (pH 7.2) 液（検体希釈液）100 μL を添加し、25°Cで 4 時間インキュベートした。その後、0.05% Tween 20 含有 10 mM PBS (pH 7.2) で洗浄し、(1) 1) で作成した HRP 標識抗体 (5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1% BSA 含有 10 mM PBS (pH 7.2) で 100 倍に希釈した溶液を 100 μL ずつそれぞれのウェルに添加し、25°Cで 2 時間インキュベートした。次に、各ウェル内の溶液を吸引除去した後、0.0 5% Tween 20 含有 10 mM PBS (pH 7.2) で洗浄し、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン塩酸塩 0.02%、H₂O₂ 2.5 mM を含有する 0. 1 M リン酸／クエン酸緩衝液 (pH 4.3) を 100 μL ずつ各ウェルに加えた。25°Cで 30 分間反応させた後、0.5 M 硫酸水溶液を 100 μL ずつ加えて酵素反応を停止させた。次に、この溶液につき分光光度計を用いて 450 nm の波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度 0 ~ 300 ng/mL に対してプロットした。結果を図 18 に示す。

2) 測定系の構築

① ビオチン化抗体の作製

30 1) の評価結果において最も液相抗原反応性の高かった #B3 抗ASTモノクローナル抗体および実施例 17 で得られた抗ASTポリクローナル抗体 (anti-

rAST-PAb) を用いて IgG のビオチン化を以下のように行った。

1～3 mg/mL の IgG/PBS (-) 溶液 1 mL と、等量の 0.2 M NaHCO₃ (pH 8.0) を混合し、つぎに 100 倍のモル濃度のビオチン化試薬 10 mM を加え、37℃で 1 時間インキュベートした。ビオチン化試薬は NHS-LC-
5 Biotin (PIERCE 社製 #21335) をジメチルホルムアミドで 10 mM に溶解し使用した。その後、10 分の 1 量の 1 M モノエタノールアミンを加え、さらに 37℃で 1 時間インキュベートした。この反応液を PBS (-) にて 2.5 mL にメスアップし、G-25 ゲル濾過カラムにかけ、PBS (-) で流出させてビオチン化 IgG を回収した。さらに、終濃度 3% になるように BSA を加え、終
10 濃度 0.1% になるように NaNO₃ を加えて保存した。

②抗体固定化プレートの調製

96 ウエルプレート (住友ベークライト社製、MS-3796F / カルボプレート) をよく洗浄し、抗体 (#B3 および anti-rAST PAb) の 20 μg/mL の PBS 溶液を 100 μL ずつ各ウェルに加え、4℃で 1 昼夜放置した。これを PBS-0.05% Tween 20 で洗浄し、1% 牛血清アルブミンの PBS 溶液を 380 μL ずつ各ウェルに加え、4℃で 1 昼夜放置するポストコーティング処理をして抗体固定化プレートを得た。

③測定系の構築

②で調製した抗AST IgG 固定化プレートに、精製した組換え AST (標準物質) を 0～400 ng/mL の範囲で含有する 1% BSA-0.1% スキムミルク含有 10 mM PBS (pH 7.2) 溶液 (検体希釈液) 50 μL および ①で作製したビオチン化 IgG を 10 μg/mL 含有する 1% BSA-0.1% スキムミルク含有 10 mM PBS (pH 7.2) 溶液を 50 μL 添加し、4℃で一晩静置した。つぎにプレートを洗浄した後、100 μL / ウェルでストレプトアビシン標識ペルオキシダーゼ (TAGO 社製、#SNN1004) を 1 万倍希釈した 1% BSA-0.1% スキムミルク含有 10 mM PBS (pH 7.2) 溶液を加え、25℃で 1 時間インキュベートした。次に各ウェル内の溶液を吸引除去した後、0.05% Tween 20 含有 10 mM PBS (pH 7.2) で洗浄し、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン塩酸塩 0.02%、H₂O₂ 2.5 mM を含有する 0.1 M リン酸 / クエン酸緩衝液 (pH 4.3) を 100 μL ずつ各ウェルに加えた。25℃で 15 分間反応させた後、0.5 M 硫酸水溶液を 100 μL ずつ加えた。

て酵素反応を停止させた。次いで、この溶液につき分光光度計を用いて450 nmの波長における吸収強度を測定し、これを標準物質濃度0～200 ng/mLに対してプロットした。結果を図19に示す。

5 産業上の利用可能性

- 本発明によれば、プロペプチド部分の全体または一部がトリプシン様蛋白部分とジスルフィド結合を介して結合する構造を有するASTが提供される。これを用いて該構造を有する酵素のPARを活性化または粘液產生亢進、EGFRシグナル伝達系活性化、細胞内カルシウム流入惹起を指標とした阻害剤のスクリーニング系を構築し、阻害剤をスクリーニングすることによって、AST阻害剤および阻害ポリペプチド（阻害抗体を含む）を得ることができる。このようにして得られたAST阻害剤もしくはASTのPAR活性化阻害剤または粘液產生亢進阻害剤、EGFRシグナル伝達系活性化阻害剤、細胞内カルシウム流入惹起阻害剤を治療薬として用いることにより、ASTのもつPAR活性化作用、EGFRシグナル伝達系活性化作用、細胞内カルシウム流入惹起作用を介することによる広義の気道炎症への作用、粘液分泌亢進作用、気道リモデリングの作用、粘液せん毛生態防御系に対する作用、凝固・線溶系における作用、細胞増殖作用あるいは癌の増殖や転移に関する作用、抗ウイルス感染作用等の生理作用を抑制もしくは修飾し、発症の予防あるいは病態における改善および治療に用いることが期待できる。
- また、本発明のマウスASTなど動物ASTの配列に基づいた、動物ASTの蛋白発現あるいは遺伝子発現を測定あるいは制御することにより、どのような病態モデル動物においてどのような時期にASTが病態に関与しているかを判定することができる。また、本発明を利用することにより選ばれたAST阻害剤および阻害ポリペプチド（阻害抗体を含む）の治療効果判定や臨床投与量の推定をすることができる。
- さらに、本発明のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色により、組織での発現部位を検出することができる。
- また、本発明のモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いた酵素免疫測定系あるいは診断薬、診断キットによれば、例えば唾液中、喀痰中あるいは血清中のAST濃度を測定することができ、AST関与の病態の把握、診断に有用である。

請求の範囲

1. 配列番号1に示されるアミノ酸配列の全部もしくは一部からなる蛋白であつて、1番目のMetから186番目のArgの間のアミノ酸配列の全部もしくは一部からなるプロペプチド部分と、187番目のIleから418番目のIleまでの232アミノ酸の配列からなるトリプシン様蛋白部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する気道特異的トリプシン様酵素。
2. 配列番号1に示される気道特異的トリプシン様酵素と66%以上のホモジーを有する哺乳類のカウンターパート蛋白であつて、該プロペプチド部分に相当する部分と該トリプシン様蛋白部分に相当する部分とが1本のジスルフィド結合で連結されている構造を有する哺乳類気道特異的トリプシン様酵素。
3. 酵素基質と測定対象化合物もしくはポリペプチドを混合し、これらと請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織を適切な条件下にインキュベートして該酵素基質と反応させ、その反応生成物を測定することにより測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素の阻害活性を検出する方法。
4. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらにプロテアーゼ活性化受容体発現細胞とを混合し、プロテアーゼ活性化受容体シグナル伝達経路の活性化を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体シグナル伝達経路の活性化に対する阻害活性を検出する方法。
5. プロテアーゼ活性化受容体がPAR2である請求項4に記載の検出方法。
6. 細胞内カルシウム濃度を指標とし、請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素による細胞内カルシウム流入惹起に対する測定対象化合物もしくはポリペプチドの阻害活性を評価する方法。

7. I L - 8 の遊離量もしくは発現量またはプロモーターの転写活性を指標とし、請求項 1 または 2 記載の気道特異的トリプシン様酵素による I L - 8 遊離亢進作用に対する測定対象化合物もしくはポリペプチドの阻害活性を評価する方法。

5

8. 請求項 1 または 2 記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、さらに粘液産生能を有する細胞とを混合し、粘液産生能を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進に対する阻害活性を検出する方法。

10

9. 粘液産生能を測定する方法が A B - P A S 染色法である請求項 8 に記載の検出方法。

15 10. 粘液産生能の指標が M u c 5 A C 発現量である請求項 8 に記載の検出方法。

11. 粘液産生能の指標が E G F R - L の遊離量もしくは産生量である請求項 8 に記載の検出方法。

20 12. 粘液産生能の指標が E G F - R シグナル伝達経路の活性化である請求項 8 に記載の検出方法。

13. 請求項 1 または 2 記載の気道特異的トリプシン様酵素もしくは該酵素発現細胞もしくは該酵素発現組織と、測定対象化合物もしくはポリペプチドと、 E G F 25 R シグナル伝達系を有する細胞とを混合し、 E G F R シグナル伝達系活性化を指標として測定対象化合物もしくはポリペプチドの気道特異的トリプシン様酵素による E G F R 経路活性化亢進に対する阻害活性を検出する方法。

14. 請求項 1 または 2 に記載の気道特異的トリプシン様酵素をコードする遺伝子、または該遺伝子由来の m R N A もしくは c D N A。

30

15. 請求項14に記載の遺伝子、mRNA、もしくはcDNAの全部または一部を用いて作製された気道特異的トリプシン様酵素の発現ベクター。

16. 請求項15記載の発現ベクターがトランスフェクトもしくはトランسفォームされた細胞。

17. 請求項16記載の細胞を培養し、培養液から請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素を精製する方法。

18. 請求項17記載の方法を用いて精製された請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素。

19. 請求項14に記載の遺伝子、mRNA、もしくはcDNAの全体もしくは一部の情報を用い、それらの核酸に対応する気道特異的トリプシン様酵素遺伝子の発現量を検出する方法。

20. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、気道特異的トリプシン様酵素の活性を阻害、または該酵素の活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

21. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体の活性化過剰もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、気道特異的トリプシン様酵素によるプロテアーゼ活性化受容体活性化を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

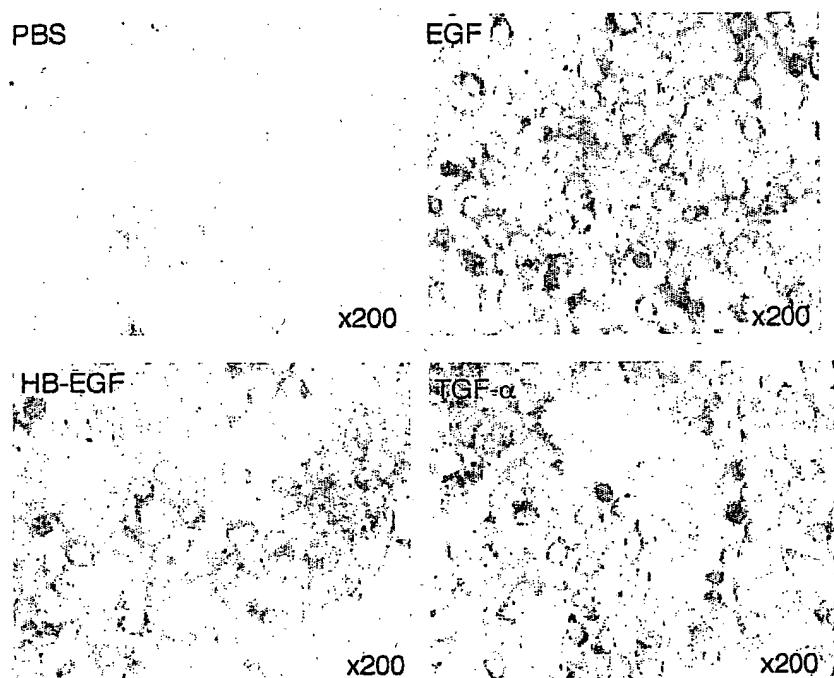
22. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、

気道特異的トリプシン様酵素による粘液産生亢進を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。

23. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素によるE G F R 経路活性化亢進もしくはアップレギュレートにより特徴づけられる疾患をもつ哺乳類に対して、測定対象の化合物もしくはポリペプチドを投与し、その効果を判定することからなる、気道特異的トリプシン様酵素によるE G F R 経路活性化亢進を阻害する物質のスクリーニング方法またはその治療効果判定方法。
- 10 24. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素に特異的に結合する抗体。
25. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体。
- 15 26. 請求項1または2記載の気道特異的トリプシン様酵素活性を阻害し、および／またはその活性化を阻害するモノクローナル抗体。
- 20 27. 請求項2-4ないし26のいずれかに記載の抗体を用いて気道特異的トリプシン様酵素を検出し、または測定する方法。

1/16

図 1



2/16

図 2

PBS

HAST

x200

x200

HB-EGF

TGF- α

x200

x200

3/16

図 3

PBS

PBS+ ロイペプチ

x200

x200

HAST

HAST+ロイペプチ

x200

x200

4 / 16

図 4

PBS

HAST

x200

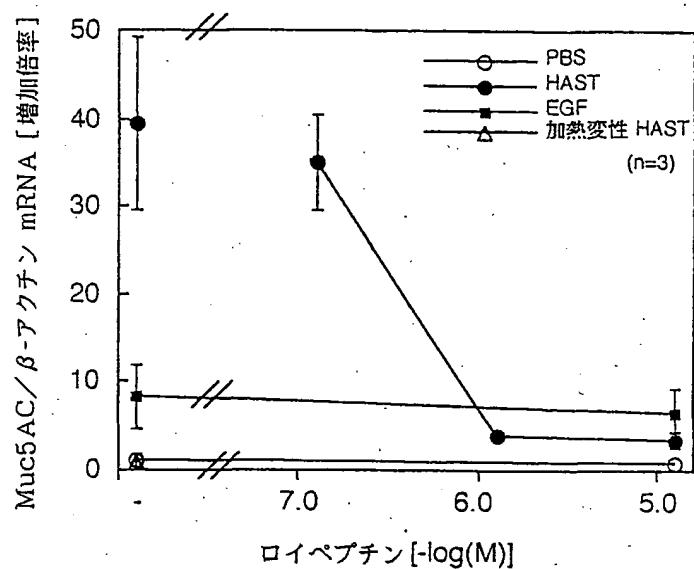
x200

加熱変性HAST

x200

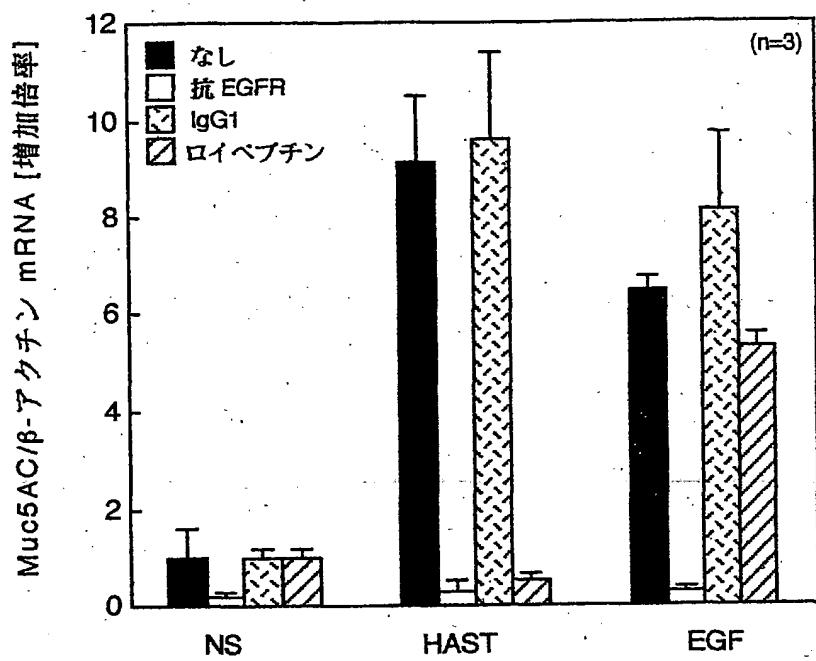
5/16

図 5



6/16

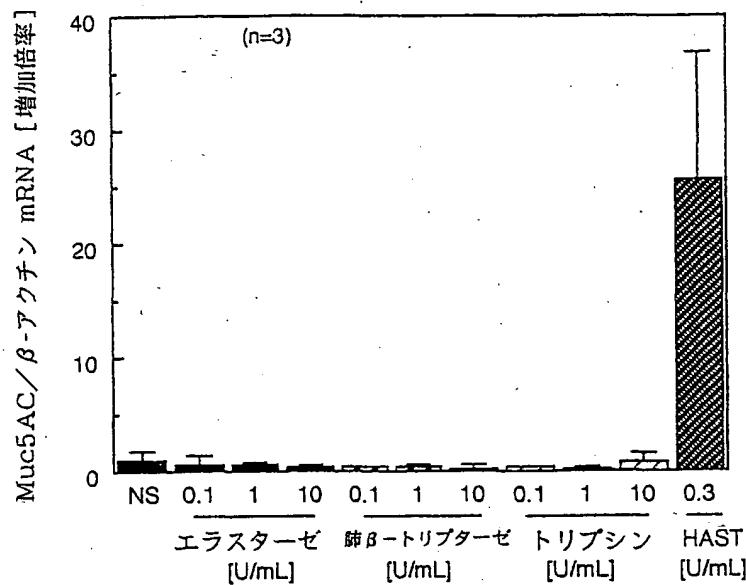
図6



差替え用紙(規則26)

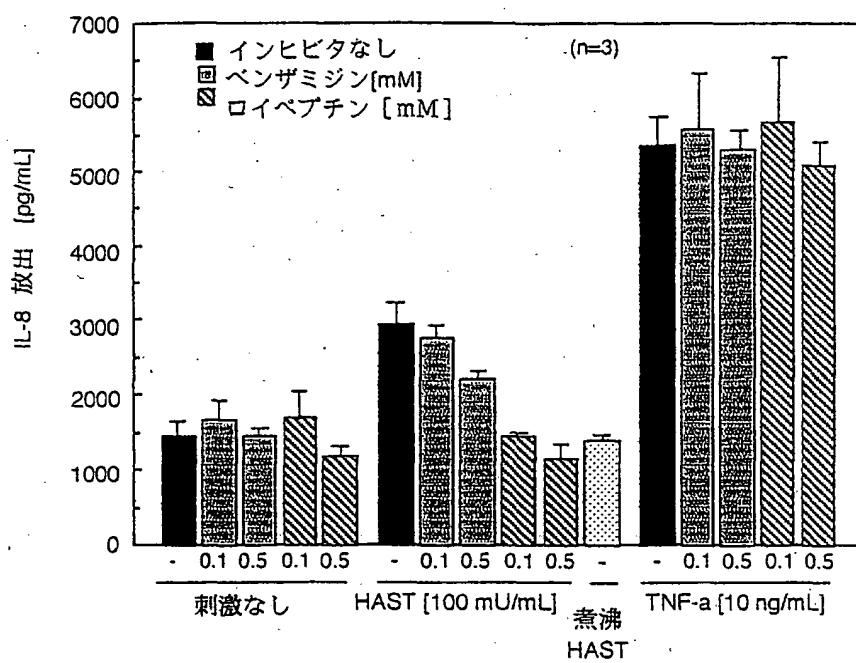
7/16

図 7



8 / 16

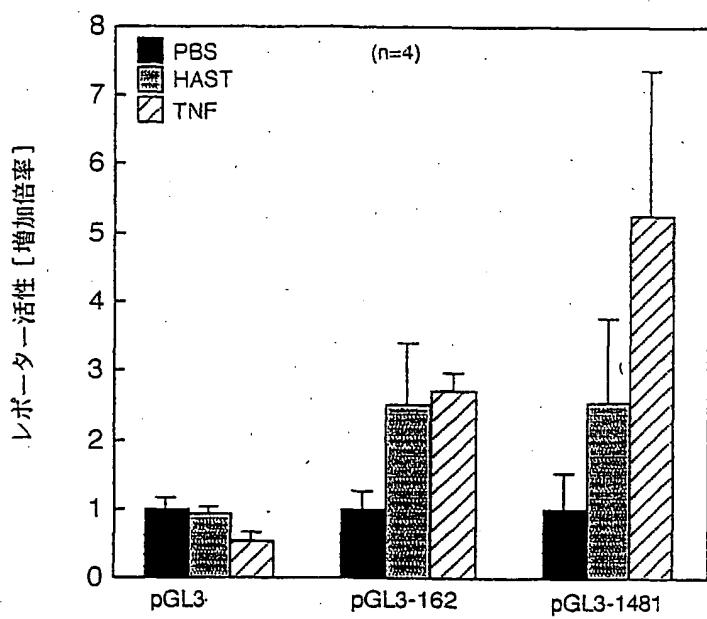
8





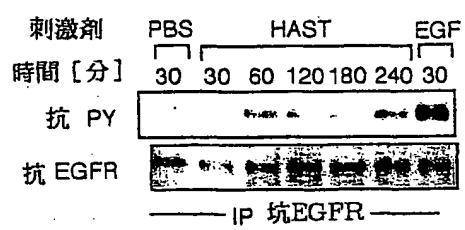
9 / 16

図 9



10 / 16

図 10



11/16

図 11.

マウス AST.蛋白	MYRPRPMLSP SRFFTPFAVA FVVIITVGLL AMMAGLLIHF LAFDKKAYFY	50
ヒト AST.蛋白	MYRPARTST SRFLNPYVVC FIVVAGVVIL AVTIALLVYF LAFDQKSYFY	50
コンセンサス	MYR.....S. SRF..P..V. F.V...V..L A....LL..F LAFD.K.YFY	50
	HSSFQILNVE YTEALNSPAT HEYRTLSERI EAMITDEFRG SSLKSEFIRT	100
	RSSFQLLNVE YNSQLNSPAT QEYRTLSGRI ESLITKTFKE SNLRNQFIRA	100
	.SSFQ.LNVE Y...LNSPAT .EYRTLS.RI E..IT..F.. S.L...FIR.	100
	HVKLRLKEGT GVVADVVMKF RSSKRNNRKV MKTRIQSVLR RL-SSSGNLE	149
	HVKLRLQDGs GVRADVVMKF QFTRNNNGAS MKSRIESVLR QMLNNSGNLE	150
	HV.KLR..G. GV.ADVVMKFNN... MK.RI.SVLRSGNLE	150
	IAPSNEITSL TDQDTENVLT QECGARPDLI TLSEERIIGG MQAEPGDWPW	199
	INPSSTEITSL TDQAAANWLI NECGAGPDLI TLSEQRILGG TEAEEGSWPW	200
	I.PS.EITSL TDQ...N.L.. ECGA.PDLI TLSE.RI.GG ..AE.G.WPW	200
	QVSQLNNNVH HCGGALISMW WVLTAAHCFK SYPNPQYWTA TFGVSTMSPR	249
	QVSLRLNNAH HCGGSLINNM WILTAAHCFR SNSNPRDWIA TSGISTTFPK	250
	QVSL.LNN.H HCGG.LI.NM W.LTAACF. S..NP..W.A.T.G.ST..P.	250
	LRVRVRAILA HDGYSSVTRD NDIAVQLDR SVAFSRNIHR VCLPAATQNI	299
	LRMRVRNILLI HNNYKSATHE NDIALVRLEN SVTFIKDIHS VCLPAATQNI	300
	LR.RVR.IL. H..Y.S.T.. NDIA.V.L.. SV.F...IH. VCLPAATQNI	300
	IPGSVAYVTG WGSLTYGGNA VTNLROGEVR IISSEECNTP AGYSGSVLPG	349
	PPGSTAVTG WGAQEYAGHT VPELROGQVR IISNDVCNAP HSYNGAILSG	350
	.PGS.AYVTG WG...Y.G.. V..LRQG.VR IIS...CN.P..Y.G..L.G	350
	MLCAGMRSGA VDACQGDSSG PLVQEDSRRL WFVVGIVSWG YQCGLPNKPG	399
	MLCAGVPQGG VDACQGDSSG PLVQEDSRRL WFIVGIVSWG DQCGLPDKPG	400
	MLCAG...G. VDACQGDSSG PLVQEDSRRL WF.VGIVSWG .QCGLP.KPG	400
	VYTRVTAYRN WIRQQTGI	417
	VYTRVTAYLD WIRQQTGI	418
	VYTRVTAY.. WIRQQTGI	418

12/16

図 12

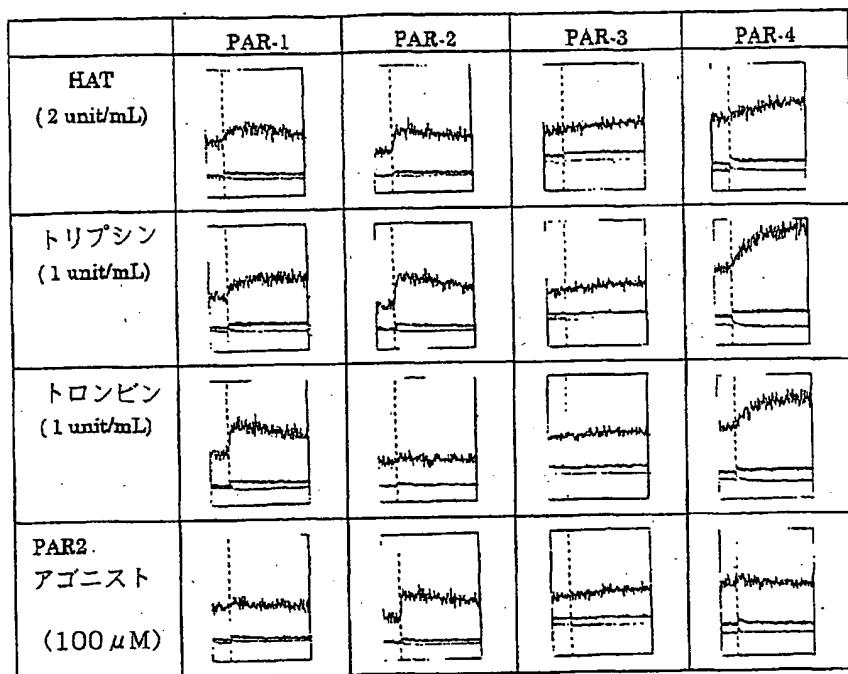
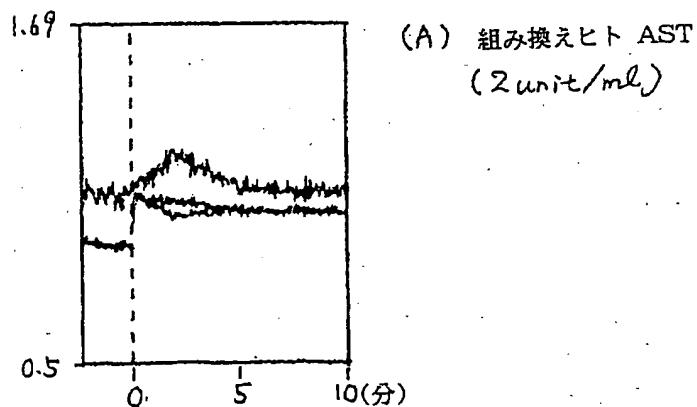


図 13

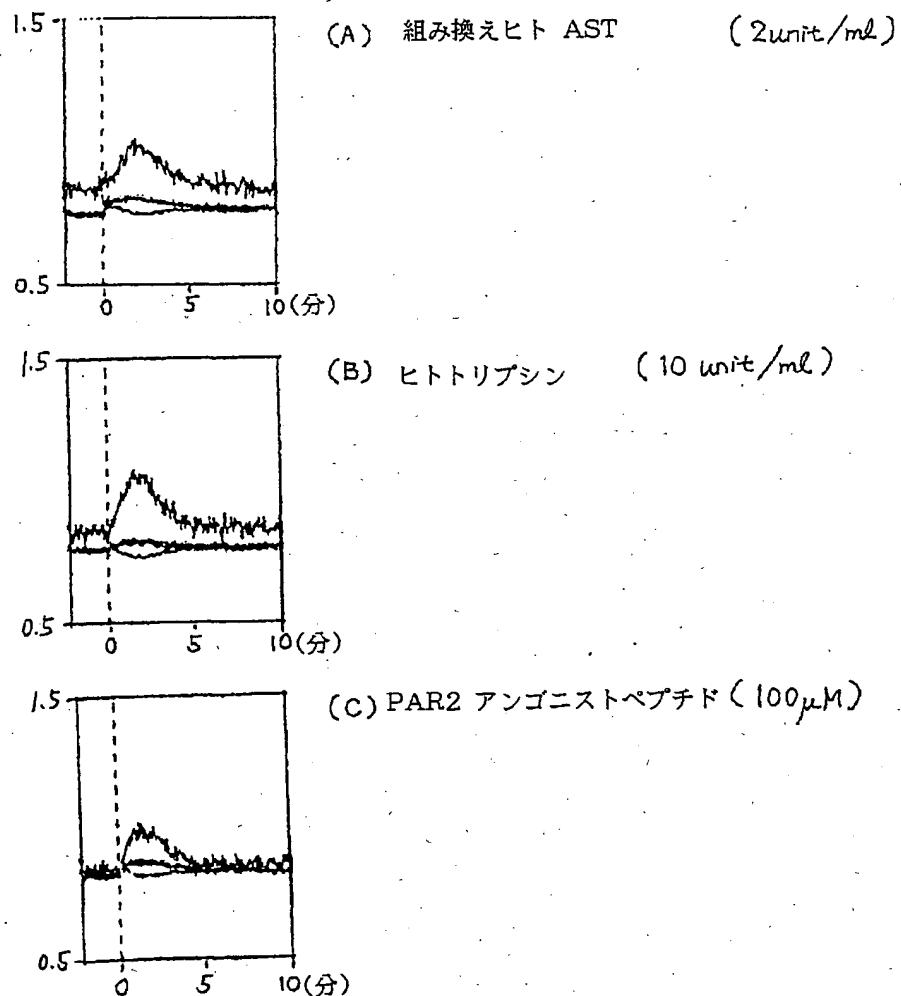
比



13/16

図 14

比



14 / 16

図 15

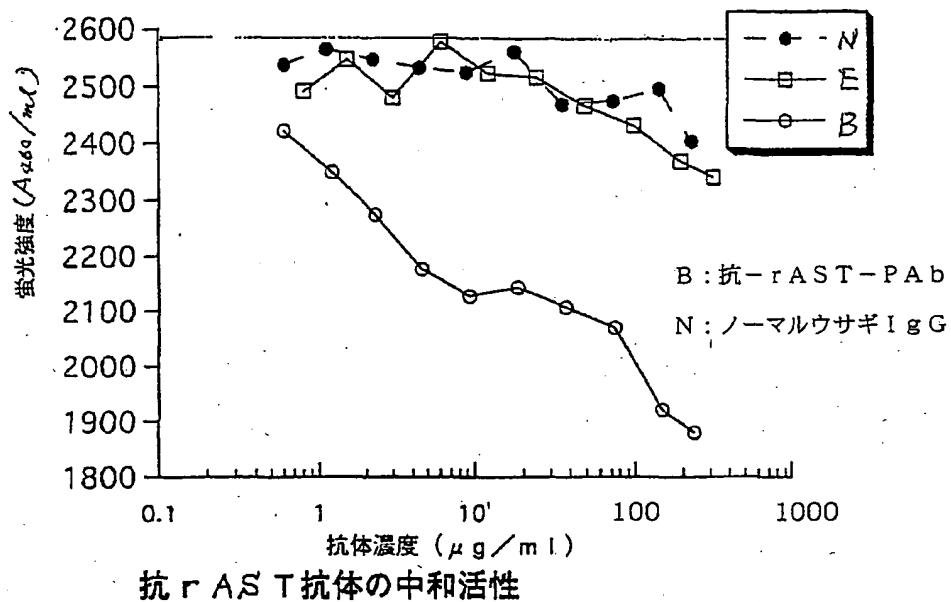
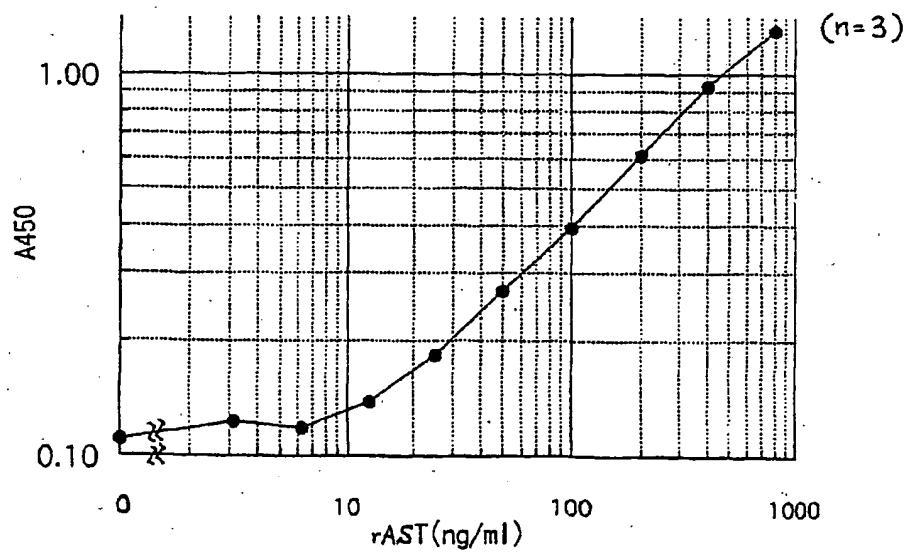
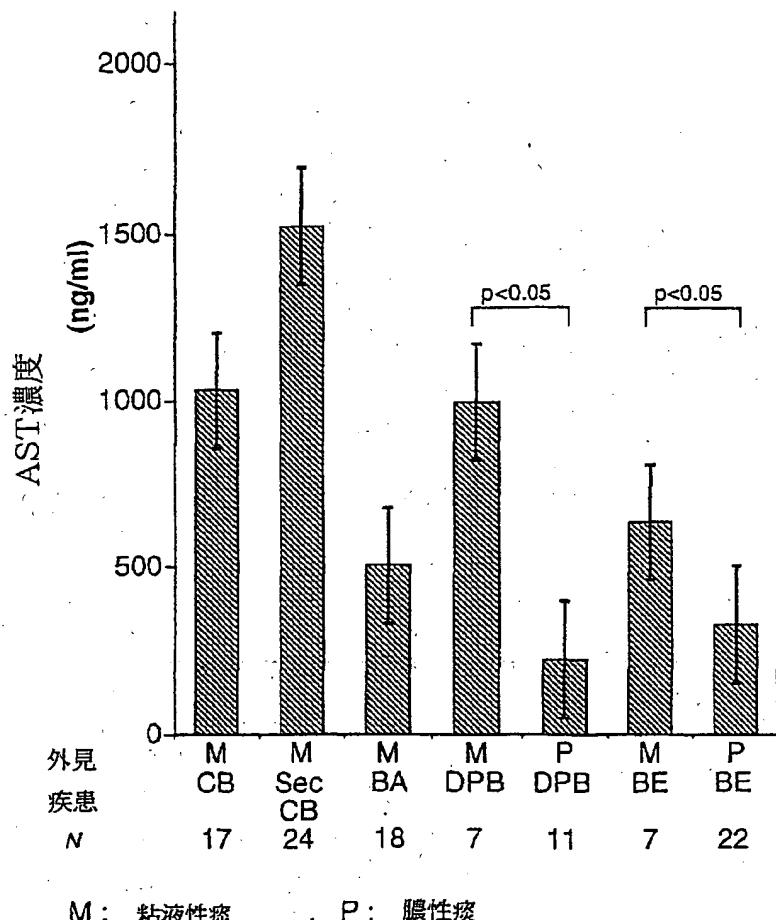


図 16



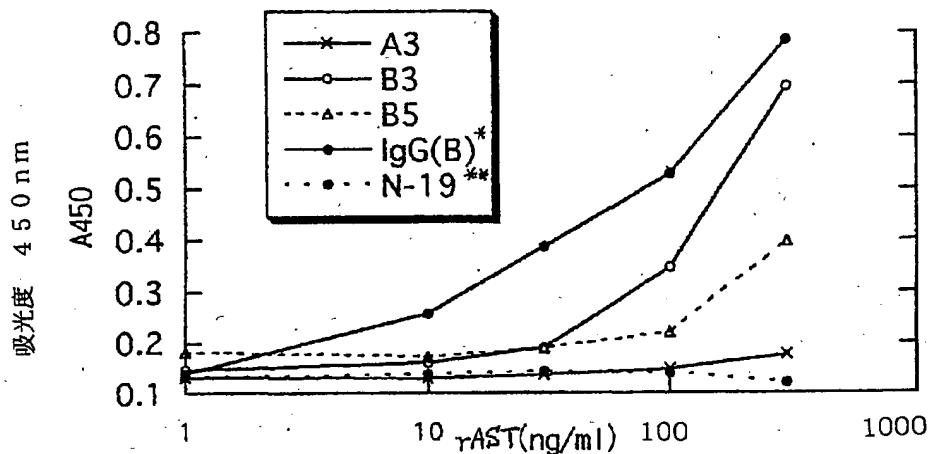
15/16

図 17



16 / 16

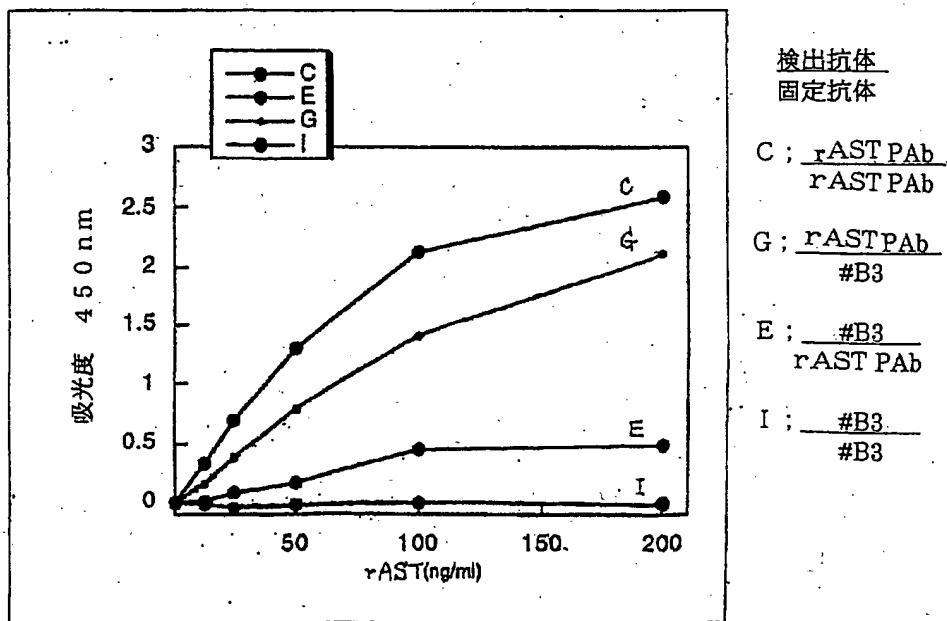
図 18



* IgG (B) ; 抗-rAST PAb

** N-19 ; 抗-N19 PAb

図 19



1 / 79

SEQUENCE LISTING

<110> TEIJIN LIMITED

EGUCHI, Hiroshi

CHOKKI, Manabu

YAMAMURA, Satoshi

MITA, Reiko

MASEGI, Tsukio

<120> 気道特異的トリプシン様酵素およびその利用法

<130> T-440

<150> JP P2000-257104

<151> 2000-08-28

<150> JP P2001-059753

<151> 2001-03-05

<160> 44

<210> 1

<211> 418

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn

1

5

10

15

Pro Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu

2/79

20 25 30

Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln

35 40 45

Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu

50 55 60

Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Thr

65 70 75

Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu

80 85 90

Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His Val Ala Lys Leu

95 100 105

Arg Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val Val Met Lys Phe

110 115 120

Gln Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile

125 130 135

Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu Glu

140 145 150

Ile Asn Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Ala Ala

155 160 165

Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly Pro Asp Leu Ile

170 175 180

3 / 79

Thr Leu Ser Glu Gln Arg Ile Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu

185 190 195

Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu Asn Asn Ala His

200 205 210

His Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Asn Met Trp Ile Leu Thr Ala

215 220 225

Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Asp Trp Ile Ala

230 235 240

Thr Ser Gly Ile Ser Thr Thr Phe Pro Lys Leu Arg Met Arg Val

245 250 255

Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Lys Ser Ala Thr His Glu

260 265 270

Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr

275 280 285

Lys Asp Ile His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile

290 295 300

Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ala Gln Glu

305 310 315

Tyr Ala Gly His Thr Val Pro Glu Leu Arg Gln Gln Val Arg

320 325 330

4/79

Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro His Ser Tyr Asn Gly

335 340 345

Ala Ile Leu Ser Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro Gln Gly Gly

350 355 360

Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu

365 370 375

Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Ile Val Gly Ile Val Ser Trp Gly

380 385 390

Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val

395 400 405

Thr Ala Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly Ile

410 415 418

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser Arg Phe Phe Thr

1 5 10 15

Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Ile Thr Val Gly Leu Leu

20 25 30

Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys

5 / 79

35 40 45

Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu

50 55 60

Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His Glu Tyr Arg Thr

65 70 75

Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp Glu Phe Arg Gly

80 85 90

Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu

95 100 105

Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val Val Met Lys Phe.

110 115 120

Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met Lys Thr Arg Ile

125 130 135

Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Ser Gly Asn Leu Glu Ile

140 145 150

Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Asp Thr Glu

155 160 165

Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr

170 175 180

Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Met Gln Ala Glu Pro Gly

185 190 195

Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val His His

200

205

210

Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val Leu Thr Ala Ala

215

220

225

His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr Trp Thr Ala Thr

230

235

240

Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg Val Arg Val Arg

245

250

255

Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val Thr Arg Asp Asn

260

265

270

Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val Ala Phe Ser Arg

275

280

285

Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Ile

290

295

300

Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Thr Tyr

305

310

315

Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly Glu Val Arg Ile

320

325

330

Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser

335

340

345

7/79

Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg Ser Gly Ala Val

350 355 360

Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp

365 370 375

Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr

380 385 390

Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr

395 400 405

Ala Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly Ile

410 415 417

<210> 3

<211> 1500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gagtgggaat ctcaaaggcag tttagttaggc agaaaaaaaga acctcttcat 50

taaggattaa a atg tat agg cca gca cgt gta act tcg act tca 94

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Thr Ser

1 5 10

aga ttt ctg aat cca tat gta gta tgt ttc att gtc gtc gca ggg 139

Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly

15 20 25

gtt gtg atc ctg gca gtc acc ata gct cta ctt gtt tac ttt tta 184

8 / 79

Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu

30

35

40

gct ttt gat caa aaa tct tac ttt tat agg agc agt ttt caa ctc 229

Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu

45

50

55

cta aat gtt gaa tat aat agt cag tta aat tca cca gct aca cag 274

Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln

60

65

70

gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg att act aaa 319

Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr Lys

75

80

85

aca ttc aaa gaa tca aat tta aga aat cag ttc atc aga gct cat 364

Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His

90

95

100

gtt gcc aaa ctg agg caa gat ggt agt ggt gtg aga gcg gat gtt 409

Val Ala Lys Leu Arg Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt caa ttc act aga aat aac aat gga gca tca atg 454

Val Met Lys Phe Gln Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met

120

125

130

aaa agc aga att gag tct gtt tta cga caa atg ctg aat aac tct 499

Lys Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Ser

135

140

145

9 / 79

gga aac ctg gaa ata aac cct tca act gag ata aca tca ctt act 544

Gly Asn Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr

150

155

160

gac cag gct gca gca aat tgg ctt att aat gaa tgt ggg gcc ggt 589

Asp Gin Ala Ala Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly

165

170

175

cca gac cta ata aca ttg tct gag cag aga atc ctt gga ggc act 634

Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gin Arg Ile Leu Gly Gly Thr

180

185

190

gag gct gag gag gga agc tgg ccg tgg caa gtc agt ctg cgg ctc 679

Glu Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Leu

195

200

205

aat aat gcc cac cac tgt gga ggc agc ctg atc aat aac atg tgg 724

Asn Asn Ala His His Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Asn Met Trp

210

215

220

atc ctg aca gca gct cac tgc ttc aga agc aac tct aat cct cgt 769

Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg

225

230

235

gac tgg att gcc acg tct ggt att tcc aca aca ttt cct aaa cta 814

Asp Trp Ile Ala Thr Ser Gly Ile Ser Thr Thr Phe Pro Lys Leu

240

245

250

aga atg aga gta aga aat att tta att cat aac aat tat aaa tct 859

Arg Met Arg Val Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Lys Ser

255

260

265

10 /79

gca act cat gaa aat gac att gca ctt gtg aga ctt gag aac agt 904
Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser

270

275

280

gtc acc ttt acc aaa gat atc cat agt gtg tgt ctc cca gct gct 949
Val Thr Phe Thr Lys Asp Ile His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala

285

290

295

acc cag aat att cca cct ggc tct act gct tat gta aca gga tgg 994
Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp

300

305

310

ggc gct caa gaa tat gct ggc cac aca gtt cca gag cta agg caa 1039
Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly His Thr Val Pro Glu Leu Arg Gln

315

320

325

gga cag gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca cca cat 1084
Gly Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro His

330

335

340

agt tat aat gga gcc atc ttg tct gga atg ctg tgt gct gga gta 1129
Ser Tyr Asn Gly Ala Ile Leu Ser Gly Met Leu Cys Ala Gly Val

345

350

355

cct caa ggt gga gtg gac gca tgt cag ggt gac tct ggt ggc cca 1174
Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro

360

365

370

cta gta caa gaa gac tca cgg cgg ctt tgg ttt att gtg egg ata 1219
Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Ile Val Gly Ile

11/79

375

380

385

gta agc tgg gga gat cag tgt ggc ctg ccg gat aag cca gga gtg 1264

Val Ser Trp Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val

390

395

400

tat act cga gtg aca gcc tac ctt gac tgg att agg caa caa act 1309

Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Gln Gln Thr

405

410

415

ggg atc tag tgcaacaagt gcatccctgt tgcaaagtct gtatgagg 1358

Gly Ile

418

gtgcctgtct taaattccaa agctttacat ttcaactgaa aaagaaaacta 1408

gaaatgtcct aatttaacat ctttgttacat aaataatggtt taacaaacac 1458

tgtttaacct ttctttatla ttaagggttt tctatttct cc 1500

<210> 4

<211> 1462

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

cgccgggcag gtcaaaggcag ctggcacac agaaaacaagg acctttcat 50

tattcaagag taaa atg tat agg cca aga cca atg cta tca ccg tca 97

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser

1

5

10

aga ttc ttc act ccc ttt gca gta gct ttc gtt gtc ata ata acg 142

Arg Phe Phe Thr Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Ile Thr

12/79

15

20

25

gta ggg ctc ctg gcc atg atg gca ggt cta ctt att cac ttt tta 187

Val Gly Leu Leu Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu

30

35

40

gct ttt gac aag aaa gct tac ttt tat cat agc agc ttt caa atc 232

Ala Phe Asp Lys Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile

45

50

55

cta aac gtt gaa tac act gag gct tta aac tca cca gct aca cac 277

Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His

60

65

70

gaa tac aga acc ttg agt gaa aga att gag gct atg att act gat 322

Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp

75

80

85

gaa ttt cga gga tca agt cta aaa agt gag ttt atc agg aca cat 367

Glu Phe Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His

90

95

100

gtt gtc aaa cta aga aaa gaa ggg act ggt gtg gtt gcg gat gtt 412

Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt cga tct agt aaa cgt aac aac aga aag gta atg 457

Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met

120

125

130

aaa acc aga att caa tct gtg cta cga aga ctc agc agc tct gga 502

13 /79

Lys Thr Arg Ile Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Ser Gly

135

140

145

aac ttg gaa ata gcc cct tcg aat gag ata aca tca ctc act gac 547

Asn Leu Glu Ile Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp

150

155

160

cag gat aca gaa aat gtt ttg act caa gaa tgt gga gca cgt cca 592

Gln Asp Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro

165

170

175

gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga atc att gga ggc atg caa 637

Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Gly Gly Met Gln

180

185

190

gct gag ccc ggt gac tgg ccc tgg caa gtc agt cta cag ctc aat 682

Ala Glu Pro Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn

195

200

205

aat gtc cac cac tgt gga ggt gcc ctg atc agt aac atg tgg gtc 727

Asn Val His His Cys Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val

210

215

220

ctg aca gca gct cat tgc ttc aaa agc tat cct aat cct caa tat 772

Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr

225

230

235

tgg aca gcc acc ttt ggg gtt tct aca atg agc cct agg ctg aga 817

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg

240

245

250

14/79

gtg aga gta agg gct att tta gcc cac gac ggg tac agc tcc gta 862

Val Arg Val Arg Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val

255

260

265

act cgt gac aat gac atc gca gtt gta caa ctt gac aga tct gtc 907

Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val

270

275

280

gcc ttt tcc aga aat atc cat agg gta tgt ctc cca gca gca acc 952

Ala Phe Ser Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr

285

290

295

caa aat atc atc cct ggt tct gtc gca tat gtt aci gga tgg gga 997

Gln Asn Ile Ile Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly

300

305

310

tct ctc aca tat gga ggc aac gca gtc aca aat cta cgg caa gga 1042

Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly

315

320

325

gaa gtc aga ata ata agt tca gaa gaa tgc aat acg cca gct ggt 1087

Glu Val Arg Ile Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly

330

335

340

tac agt gga agt gtc ttg cca gga atg ctg tgt gct gga atg cgt 1132

Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg

345

350

355

tca ggg gcc gtg gat gca tgc cag ggt gat tca ggt ggc ccg cta 1177

Ser Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

360

365

370

15/79

gta caa gaa gac tca agg cgg ctt tgg tt ttt gtt gtg ggc att gtg 1222
Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val

375

380

385

agc tgg gga tat cag tgc tgc cca aat aag cca ggc gtg tat 1267
Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr

390

395

400

act cga gtg aca gcc tac cgc aac tgg atc aga cag cag acg gga 1312
Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Gln Thr Gly

405

410

415

atc tag tgcaaccgag gaaaaaacgt gccatgaggt ctctgtatcc 1358

Ile

417

aagtgtgact gactcggtatg ccatggcttc acatttcaac tgcaaaggag 1408

actggaaaatg ccccttctga cgtccccataataatgg tttaactgtt 1458

tagt 1462

<210> 5

<211> 1462

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 5

cgccgggcag gucaaaggcag cuggacacac agaaacaagg accuuuuau uauucaagag 60
aaaaauguau aggccaagac caaugcuau accguuaga uucuuucacuc ccuuugcagu 120
agcuuuucguu gucauaauaa cgguagggcu ccuggccaug auggcagguc uacuuauuca 180
cuuuuuuagcu uuugacaaga aagcuuacuu uuaucauagc agcuuuucaaa uccuuaacgu 240
ugaauacacu gaggcuuuua acucaccaggc uacacacgaa uacagaaccu ugagugaaag 300

16 / 79

aauugaggcu augauuacug augaauuucg aggaucagu cuaaaaagug aguuuaucag 360
gacacauguu gucaaacuaa gaaaagaagg gacuggugug guugcggaa uugucaugaa 420
auuucgaucu aguaaacgua acaacagaaa gguuaugaaa accagaauuc aaucugugcu 480
acgaagacuc agcagcucug gaaacuugga aauagccccu ucgaauugaga uaacaucacu 540
cacugaccag gauacagaaa auguuuugac ucaagaauug ggagcacguc cagaccuuau 600
aacacuguca gaagagagaa ucauuggagg caugcaagcu gagcccgug acuggccug 660
gcaagucagu cuacagcuca auaaugucca ccacugugga ggugccuga ucaguaacau 720
guggguccug acagcagcuc auugcuucaa aagcuauccu aquccucaa auuggacagc 780
caccuuuggg guuucuacaa ugagccuag gcugagagug agaguaaggg cuauuuuagc 840
ccacgacggg uacagcuccg uaacucguga caaugacauc gcaguuguac aacuugacag 900
aucugucgc uuuuccagaa auauccuauag gguauugucuc ccagcagcaa cccaaaaauau 960
cauuccuggu ucugucgcau auguuuacagg auggggauca cucacauaau gaggcaacgc 1020
agucacaaa cuacggcaag gagaagucag aauauuaagu ucagaagaaau gcaauacgcc 1080
agcugguuac aguggaagug ucuuggcagg aaugcugugu gcuggaaugc guucagggc 1140
cguggaagca ugcccaggug auucaggugg cccgcuagua caagaagacu caaggcggcu 1200
uugguuuguu gugggcäuug ugagcugggg auaucagugu gcccuuccaa auagccagg 1260
cguguauacu cgagugacag ccuaccgcaa cuggaucaga cagcagacgg gaaucuagug 1320
caaccgagga aaaaacgugc caugaggucu cuguauccaa gugugacuga cucggaugcc 1380
auggcuucac auuuaacug caaaggagac ugaaaugcc cciucugacg ucccauuaca 1440
uaauuugguu uaacuguuua gu 1462

<210> 6

<211> 1462

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

cgcggcggcag gtcaaaggcag ctggcacac agaaacaagg accctttcat 50
tatcaagag taaa atg tat agg cca aga cca atg cta tca ccg tca 97

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Met Leu Ser Pro Ser

17/79

aga ttc ttc act ccc ttt gca gta gct ttc gtc ata ata acg 142
Arg Phe Phe Thr Pro Phe Ala Val Ala Phe Val Val Ile Thr

15

20

25

gta ggg ctc ctg gcc atg atg gca ggt cta ctt att cac ttt tta 187
Val Gly Leu Leu Ala Met Met Ala Gly Leu Leu Ile His Phe Leu

30

35

40

gct ttt gac aag aaa gct tac ttt tat cat agc agc ttt caa atc 232
Ala Phe Asp Lys Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile

45

50

55

cta aac gtt gaa tac act gag gct tta aac tca cca gct aca cac 277
Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr His

60

65

70

gaa tac aga acc ttg agt gaa aga att gag gct atg att act gat 322
Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ala Met Ile Thr Asp

75

80

85

gaa ttt cga gga tca agt cta aaa agt gag ttt atc agg aca cat 367
Glu Phe Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ser Glu Phe Ile Arg Thr His

90

95

100

gtt gtc aaa cta aga aaa gaa ggg act ggt gtg gtt gcg gat gtt 412
Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Thr Gly Val Val Ala Asp Val

105

110

115

gtc atg aaa ttt cga tct agt aaa cgt aac aac aga aag gta atg 457
Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Asn Asn Arg Lys Val Met

18/79

120

125

130

aaa acc aga att caa tct gtg cta cga aga ctc agc agc tct gga 502

Lys Thr Arg Ile Gln Ser Val Leu Arg Arg Leu Ser Ser Gly

135

140

145

aac ttg gaa ata gcc cct tcg aat gag ata aca tca ctc act gac 547

Asn Leu Glu Ile Ala Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp

150

155

160

cag gat aca gaa aat gtt ttg act caa gaa tgt gga gca cgt cca 592

Gln Asp Thr Glu Asn Val Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro

165

170

175

gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga atc att gga ggc atg caa 637

Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Met Gln

180

185

190

gct gag ccc ggt gac tgg ccc tgg caa gtc agt cta cag ctc aat 682

Ala Glu Pro Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn

195

200

205

aat gtc cac cac tgt gga ggt gcc ctg atc agt aac atg tgg gtc 727

Asn Val His His Cys Gly Ala Leu Ile Ser Asn Met Trp Val

210

215

220

ctg aca gca gct cat tgc ttc aaa agc tat cct aat cct caa tat 772

Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Tyr Pro Asn Pro Gln Tyr

225

230

235

tgg aca gcc acc ttt ggg gtt tct aca atg agc cct agg ctg aga 817

19/79

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Met Ser Pro Arg Leu Arg

240

245

250

gtg aga gta agg gct att tta gcc cac gac ggg tac agc tcc gta 862

Val Arg Val Arg Ala Ile Leu Ala His Asp Gly Tyr Ser Ser Val

255

260

265

act cgt gac aat gac atc gca gtt gta caa ctt gac aga tct gtc 907

Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Asp Arg Ser Val

270

275

280

gcc ttt tcc aga aat atc cat agg gta tgt ctc cca gca gca acc 952

Ala Phe Ser Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr

285

290

295

caa aat atc atc cct ggt tct gtc gca tat gtt aca gga tgg gga 997

Gln Asn Ile Ile Pro Gly Ser Val Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly

300

305

310

tct ctc aca tat gga ggc aac gca gtc aca aat cta cgg caa gga 1042

Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Ala Val Thr Asn Leu Arg Gln Gly

315

320

325

gag gtc aga ala ata agt tca gag gaa tgc aat acg cca gct ggt 1087

Glu Val Arg Ile Ile Ser Ser Glu Glu Cys Asn Thr Pro Ala Gly

330

335

340

tat agt gga agt gtc ttg cca gga atg ctg tgt gct gga atg cgt 1132

Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Met Arg

345

350

355

21 /79

<400> 7

aaggatccat gggccgcgg cggctgct 28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

tgggaattcc taagtttaaca gcttttttg 28

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

ccttggatc caggaggatg cgaggcccc 29

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

22 / 79

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

ctgiggaatt cccatctgag gaccctggaaa act 33

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cctttggalc catgaaagcc ctcatcttgc cag 33

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cctttgaatt cctattttgt aaggtaagca gtgga 35

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

23 / 79

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ccttttagatc tattgggggg cgactgctcc tg 32

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

cctttgaatt ctgtcacatgg agcaaagagg a 31

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

tttactgitt tcgttaacagt ttig 24

<210> 16

24/79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

caacaacgca cagaatctag 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ctgacngcng cncaytgctt 20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

gtcrcccctgr cangcrtc 18

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 19

acgcattcca gcacacagca 20

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 20

cacaaatcta cggcaaggag aggttag 27

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

26 / 79

<400> 21

gaaccttatta ttctgaccgc tccttgc 27

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggaatgttgt gtgctggaa 20

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

ccaaaggatc caaaatgtata ggccaagacc aatgtatca c 41

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

27 / 79

<223> PCR primer

<400> 24

cctttaaatt cggAACgtca gaaggggcat ttccagtct 39

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Leu Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln

1

5

10

15

Val Ser Leu Arg Cys

20

<210> 26

<211> 1555

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<220>

<221> CDS

<222> (106)...(1359)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (106)...(663)

<220>

28 / 79

<221> trypsin-like protein portion

<222> (664)...(1359)

<400> 26

gttctttcta gatccacata atacattagt agtcattcat ttgagtgaa atctcagagt 60
ggicagatag cagcaaaaag gacagcctca caaticagga ttaaa atg tat agg cca 117

Met Tyr Arg Pro

1

gca aca gta cga tca gct tca aga tct ctg aat cca tac aca gta tgt 165
Ala Thr Val Arg Ser Ala Ser Arg Ser Leu Asn Pro Tyr Thr Val Cys

5

10

15

20

ttt att gtt gtc gca gtg gtg gtg atc ctg gca gtg acc ata gct cta 213
Phe Ile Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu

25

30

35

ctt gtc cac ttt tta gct ttt gat caa aaa gct tac ttt tac cat agt 261
Leu Val His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ala Tyr Phe Tyr His Ser

40

45

50

aga ttt caa atc cta aat gtt gaa tat agt gat gag cta aat tca cca 309
Arg Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu Tyr Ser Asp Glu Leu Asn Ser Pro

55

60

65

gct aca cag aaa tat agg tct ttg agt gga aga att gaa tct atg att 357
Ala Thr Gln Lys Tyr Arg Ser Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Met Ile

70

75

80

act aga aca ttt aag gag tca aat tta aga aat cag itc gig aga gct 405
Thr Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Val Arg Ala

29 /79

85 90 95 100

cat gtt gtc aaa ctg agg caa agt ggt agt ggt gtg ata gca gat att 453
His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly Ser Gly Val Ile Ala Asp Ile

105 110 115

gtc atg aaa ttt aaa ttc acc aga tat aac aat gga gca tca atg aaa 501
Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Tyr Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys

120 125 130

agc aga att gag tct gtt tta cgc caa atg ctg aat aac act gga aac 549
Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Arg Gln Met Leu Asn Asn Thr Gly Asn.

135 140 145

ttg gta atg aac cct tca act gag tta aca cca ata aca gac cag gat 597
Leu Val Met Asn Pro Ser Thr Glu Leu Thr Pro Ile Thr Asp Gln Asp

150 155 160

aca gta aat att ttc act caa gga tgt ggg gcc cgt cca gac cta ata 645
Thr Val Asn Ile Phe Thr Gln Gly Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile

165 170 175 180

aca ttg tct gaa gag aga atc ata ggc ggc act aag gct gag gaa gga 693
Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Lys Ala Glu Glu Gly

185 190 195

gac tgg ccc tgg caa gtc agt ctg cag cgg aat aat ctt cat cac tgt 741
Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Arg Asn Asn Leu His His Cys

200 205 210

gga ggc gtc ttg atc agt aac aga tgg atc ctg act gca gct cac tgc 789

30 / 79

Gly Gly Val Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys

215

220

225

ttc aga agc tac tct gat cct cgc cag tgg act gtc acc ttt ggt att 837
Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Val Thr Phe Gly Ile

230

235

240

tcc act ata ttt cct aaa gac aga ata gga gta agg aat att tta atc 885
Ser Thr Ile Phe Pro Lys Asp Arg Ile Gly Val Arg Asn Ile Leu Ile
245 250 255 260cat aac aat tat aac cct gaa act cat gaa aat gat att gcg ctt gta 933
His Asn Asn Tyr Asn Pro Glu Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val
265 270 275caa ctc aac aga gaa gtc gcc ttt acc aaa aat atc cat tca gtg tgt 981
Gln Leu Asn Arg Glu Val Ala Phe Thr Lys Asn Ile His Ser Val Cys
280 285 290ctc cca gag gcc acc caa act att cca cct ggt tcc acg gct tat gta 1029
Leu Pro Glu Ala Thr Gln Thr Ile Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val
295 300 305aca gga tgg gga tca caa aga tat agc ggc aac aca gtt cca gat cta 1077
Thr Gly Trp Gly Ser Gln Arg Tyr Ser Gly Asn Thr Val Pro Asp Leu
310 315 320gag caa gta cgg gtc aat ata ata agt aac gat gta tgt aat tcg cca 1125
Glu Gln Val Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ser Pro
325 330 335 340

31 /79

gct ggt tat aat ggg gat gtc ctg cct gga atg cta tgt gct ggg cta 1173
Ala Gly Tyr Asn Gly Asp Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Leu

345 350 355

cct gaa ggg gga gca gat gca tgc cag ggt gac tct ggt ggc cca cta 1221
Pro Glu Gly Gly Ala Asp Ala Cys Gin Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

360 365 370

cag cag gag gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctt gtg ggg ata gta agc 1269
Gln Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser

375 380 385

tgg egg tat cag tgt ggt ctg cca gat aag cca gga gtg tac act cga 1317
Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg

390 395 400

gtg aca gcc tac cgg gac tgg ata gcc caa caa act ggg atc tag cacaa 1367
Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Ile
405 410 415 418

taaatacacc tctctagcaa gccggtgcac acacaigctc gtcataatt ccaaacttta 1427
ctttccagcc acaaagaat acatgtttca caaacactat ttaatcttta ttactatgga 1487
ttttatatic tctcaagaag atttagatga atgttgcatg gtactgtgga tataatgccgg 1547
gggaaaca 1555

<210> 27

<211> 418

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

32 / 79

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 27

Met	Tyr	Arg	Pro	Ala	Thr	Val	Arg	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Asn
1														15
Pro	Tyr	Thr	Val	Cys	Phe	Ile	Val	Val	Ala	Val	Val	Val	Ile	Leu
						20							25	30
Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	His	Phe	Leu	Ala	Phe	Asp	Gln
						35			40				45	
Lys	Ala	Tyr	Phe	Tyr	His	Ser	Arg	Phe	Gln	Ile	Leu	Asn	Val	Glu
						50			55				60	
Tyr	Ser	Asp	Glu	Leu	Asn	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	Tyr	Arg	Ser
						65			70			75		
Leu	Ser	Gly	Arg	Ile	Glu	Ser	Met	Ile	Thr	Arg	Thr	Phe	Lys	Glu
						80			85			90		
Ser	Asn	Leu	Arg	Asn	Gln	Phe	Val	Arg	Ala	His	Val	Val	Lys	Leu
						95			100			105		
Arg	Gln	Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Lys	Phe
						110			115			120		
Lys	Phe	Thr	Arg	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ala	Ser	Met	Lys	Ser	Arg	Ile
						125			130			135		
Glu	Ser	Val	Leu	Arg	Gln	Met	Leu	Asn	Asn	Thr	Gly	Asn	Leu	Val
						140			145			150		
Met	Asn	Pro	Ser	Thr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ile	Thr	Asp	Gln	Asp	Thr
						155			160			165		
Val	Asn	Ile	Phe	Thr	Gln	Gly	Cys	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Leu	Ile

33/79

170	175	180
Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Lys Ala Glu Glu		
185	190	195
Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Arg Asn Asn Leu His		
200	205	210
His Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Thr Ala		
215	220	225
Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Val		
230	235	240
Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ile Phe Pro Lys Asp Arg Ile Gly Val		
245	250	255
Arg Asn Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Glu Thr His Glu		
260	265	270
Asn Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Asn Arg Glu Val Ala Phe Thr		
275	280	285
Lys Asn Ile His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Thr Ile		
290	295	300
Pro Pro Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Arg		
305	310	315
Tyr Ser Gly Asn Thr Val Pro Asp Leu Glu Gln Val Arg Val Asn		
320	325	330
Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ser Pro Ala Gly Tyr Asn Gly		
335	340	345
Asp Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly		
350	355	360
Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Gln Gln Glu		
365	370	375
Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp Gly		
380	385	390
Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val		
395	400	405

34/79

Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Ala Gln Gln Thr Gly Ile

410

415

418

<210> 28

<211> 1520

<212> DNA

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> CDS

<222> (100)...(1356)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (100)...(657)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (658)...(1356)

<400> 28

aactatagat ccacgtata catgagagtc attcatttga gtggaaatcY caaaggcatt 60

gagtaggcag aaaaaggagc ctcctcatta aggattaaa atg tat agg cca gca 114

Met Tyr Arg Pro Ala

1

5

cgt gta cca tcg act tca aga ttt ctg aat cca tat gtc gta tgt ttc 162

Arg Val Pro Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val Cys Phe

10

15

20

att gtc gtc gca ggg gta gtg atc ctg gca gtg acc ata gct cta ctt 210

35 / 79

Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala Leu Leu

25

30

35

gtt tac ttt tta gct ttt gat caa aaa tct tac ttt tac agg agc agt 258
Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr Arg Ser Ser

40

45

50

ttt caa ctc cta aat gtt gaa tat aat agt cag tta aat tca cca gct 306
Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln Leu Asn Ser Pro Ala
55 60 65aca cag gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg att act 354
Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu Ile Thr
70 75 80 85aga aca ttc aaa gaa tca aat tta aga aac cag ttc atg aga gct cat 402
Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Met Arg Ala His

90

95

100

gtt gtc aaa ctg agt caa gat ggt agt ggt gtg aga gcg gat gtt gtc 450
Val Val Lys Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Val Arg Ala Asp Val Val

105

110

115

atg aaa ttt cga ttc act aga aat aac aat gga gca tca atg aaa agc 498
Met Lys Phe Arg Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Ser Met Lys Ser
120 125 130aga att gag tct gtt tta caa caa atg ctg aat aac tct gga aat ttg 546
Arg Ile Glu Ser Val Leu Gln Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu

135

140

145

36 / 79

gaa ata aac tct tca act gag ata aca tca ctt act gac cag gct gca 594

Glu Ile Asn Ser Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Ala Ala

150 155 160 165

gca aat tgg ctt att aaY gaa tgt ggg gcc ggt cca gac cta ata aca 642

Ala Asn Trp Leu Ile Xaa Glu Cys Gly Ala Gly Pro Asp Leu Ile Thr

170 175 180

tgg tct gag cag aga atc att gga ggc act gag gct gag gag gga agc 690

Leu Ser Glu Gln Arg Ile Ile Gly Gly Thr Glu Ala Glu Glu Gly Ser

185 190 195

tgg cca tgg caa gtc agt cta cgg gta aat aat gcc cac cac tgt gga 738

Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Val Asn Asn Ala His His Cys Gly

200 205 210

ggc agc ctg atc agt aac acg tgg atc ctg aca gca gct cac tgc ttc 786

Gly Ser Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe

215 220 225

aga agc aac tcc aat cct cgt gaa tgg att gcc acc ttt ggt att tcc 834

Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Glu Trp Ile Ala Thr Phe Gly Ile Ser

230 235 240 245

aca aca aat cct aga cta aga atg aga gta aga agt att tta att cat 882

Thr Thr Asn Pro Arg Leu Arg Met Arg Val Arg Ser Ile Leu Ile His

250 255 260

aac aat tat ata tct gca act cat gaa aat gac att gca ctt gtg aga 930

Asn Asn Tyr Ile Ser Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Leu Val Arg

265 270 275

37 / 79

ctt gag aac agt gtc acc ttt acc aga gac atc cat agt gtg tgt ctc 978
Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr Arg Asp Ile His Ser Val Cys Leu

280

285

290

cca gct gct acc cag aat att cca ctt ggc tct act gct tat gta aca 1026
Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Pro Leu Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr

295

300

305

gga tgg ggt gct caa gaa tat gct ggc tcc aca gtt tca gag cta agg 1074
Gly Trp Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly Ser Thr Val Ser Glu Leu Arg

310

315

320

325

caa gca caa gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca cca tat 1122
Gln Ala Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala Pro Tyr

330

335

340

agt tat aat gga ggc atc ttg ccc gga atg cta tgt gct gga gta cct 1170
Ser Tyr Asn Gly Gly Ile Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro

345

350

355

caa ggt gga gtg gat gca tgt cag ggt gac tct ggt ggc ccc cta gta 1218
Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val

360

365

370

cag gaa gac tca cgg cgg ctt tgg tt ttt ctt gtg ggg ata gta agc tgg 1266
Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp

375

380

385

gga gat cag tgt ggc ctg cca gat agg cca gga gtg tat acc cga gtg 1314
Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Arg Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val

38 / 79

390 395 400 405

aca acc tac cga gac tgg att agg caa cga act ggg atc tag tgcaccaag 1365

Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Arg Thr Gly Ile

410 415 418

tgcatccctig ttgcaaaggc tgtatgcggg tggtccgttc ttaatttcca aagctttaca 1425

tttcaaccga aaaagaaact ggaaatgtcc taatttaca acttgttaca taaacatgtt 1485

ttaataataa taaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaa 1520

<210> 29

<211> 418

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 29

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Pro Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1 5 10 15

Tyr Val Val Cys Phe Ile Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val

20 25 30

Thr Ile Ala Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35 40 45

Phe Tyr Arg Ser Ser Phe Gln Leu Leu Asn Val Glu Tyr Asn Ser Gln

39 / 79

50 55 60
Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile
65 70 75 80
Glu Ser Leu Ile Thr Arg Thr Phe Lys Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln
85 90 95
Phe Met Arg Ala His Val Val Lys Leu Ser Gln Asp Gly Ser Gly Val
100 105 110
Arg Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly
115 120 125
Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Val Leu Gln Gln Met Leu Asn
130 135 140
Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Asn Ser Ser Thr Glu Ile Thr Ser Leu
145 150 155 160
Thr Asp Gln Ala Ala Ala Asn Trp Leu Ile Asn Glu Cys Gly Ala Gly
165 170 175
Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Gln Arg Ile Ile Gly Gly Thr Glu
180 185 190
Ala Glu Glu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Val Asn Asn
195 200 205
Ala His His Cys Gly Ser Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr
210 215 220
Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Asn Ser Asn Pro Arg Glu Trp Ile Ala
225 230 235 240
Thr Phe Gly Ile Ser Thr Thr Asn Pro Arg Leu Arg Met Arg Val Arg
245 250 255
Ser Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Ile Ser Ala Thr His Glu Asn Asp
260 265 270
Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Asn Ser Val Thr Phe Thr Arg Asp Ile
275 280 285
His Ser Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Asn Ile Pro Leu Gly Ser
290 295 300

40 / 79

Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ala Gln Glu Tyr Ala Gly Ser Thr
305 310 315 320
Val Ser Glu Leu Arg Gln Ala Gln Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val
325 330 335
Cys Asn Ala Pro Tyr Ser Tyr Asn Gly Gly Ile Leu Pro Gly Met Leu
340 345 350
Cys Ala Gly Val Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
355 360 365
Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
370 375 380
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Gln Cys Gly Leu Pro Asp Arg Pro Gly
385 390 395 400
Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Arg Thr
405 410 415
Gly Ile
418

<210> 30

<211> 1406

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220>

<221> CDS

<222> (110)...(1366)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (110)...(667)

<220>

41/79

<221> trypsin-like protein portion

<222> (668)...(1366)

<400> 30

gagtttccttc atagatcacaca cataatatata gagagtcatc catlgtgtaa gaaaatcttag 60
agaaggtaga taggcagcag aaaggatctc ttcatatttcc aggtcaaa atg tat agg 118

Met Tyr Arg

1

cca gca cgg gtg cca tca ggc tca aga ttc ctg aat cca tat gta gtg 166
Pro Ala Arg Val Pro Ser Gly Ser Arg Phe Leu Asn Pro Tyr Val Val

5

10

15

tgt ttc gtt gtt gtg gca ggg gtg gta atc ctg gcc gta acc ata gct 214
Cys Phe Val Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val Thr Ile Ala
20 25 30 35

cta ctc atc cac ttc tta gcg ttt gat caa aag tct tac ttt tac cat 262
Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr Phe Tyr His

40

45

50

agc agt ttt caa atc cta aat gtc caa tat agt aat caa tta aat tca 310
Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Gln Tyr Ser Asn Gln Leu Asn Ser

55

60

65

cca ggg aca caa gaa tac agg act ttg agt gga aga att gaa tct ctg 358
Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile Glu Ser Leu

70

75

80

att act aaa aca ttc aga gaa tca aat tta aga aat cag ttc atc aga 406
Ile Thr Lys Thr Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg

42 / 79

85

90

95

gct cat gtt gtc aaa ctg agg caa gaa ggt aat ggt gtg ata gca gat 454

Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val Ile Ala Asp

100

105

110

115

gtt gtc atg aaa ttt aaa ttc act aga aat aac aat gga gca ttg atg 502

Val Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly Ala Leu Met

120

125

130

aaa agc aga att aag tct gtt tta cac caa atg ctg aat aat tct gga 550

Lys Ser Arg Ile Lys Ser Val Leu His Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly

135

140

145

aac ttg gaa ata agc cct tca act gag ata aca tcc att act gac cag 598

Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Ile Thr Asp Gln

150

155

160

gat aca gta aat att ttc act gaa gga tgt ggg gcc cgt cca gac cta 646

Asp Thr Val Asn Ile Phe Thr Glu Gly Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu

165

170

175

ata act ttg tct gag gag agg atc cta gga ggc aac aag gct gaa gaa 694

Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Leu Gly Gly Asn Lys Ala Glu Glu

180

185

190

195

gga gat tgg cca tgg caa gtc agt cta cag aag aat aat gtt cac cac 742

Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Lys Asn Asn Val His His

200

205

210

tgt gga ggt gtc ctg atc agt agc atg tgg atc ctg tca gca gct cac 790

43 / 79

Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Ser Met Trp Ile Leu Ser Ala Ala His

215

220

225

tgc ttc aga agc caa tct aat cct cgt cag tgg act gcc atc ttt ggt 838

Cys Phe Arg Ser Gln Ser Asn Pro Arg Gln Trp Thr Ala Ile Phe Gly

230

235

240

gct tca ata gca ttt cct aaa cag aaa aga aga gta agg act att tta 886

Ala Ser Ile Ala Phe Pro Lys Gln Lys Arg Arg Val Arg Thr Ile Leu

245

250

255

atc cat aac aat tat aac cct gca act cat gaa aat gat att gca gct 934

Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Ala Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Ala

260

265

270

275

ata caa ctt gaa gga ggt atc aac ttt acc aaa aat atc cat agg gtg 982

Ile Gln Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Thr Lys Asn Ile His Arg Val

280

285

290

tgt ctc cca gag gct acc cag aat att cca cct ggt tct tct gct tat 1030

Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser Ser Ala Tyr

295

300

305

gta aca gga tgg gga tct caa gaa tac ggt ggt aac aca gtt tca gat 1078

Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Glu Tyr Gly Gly Asn Thr Val Ser Asp

310

315

320

cta cag caa gca cgg gtc aga ata ata agt aat gat gta tgt aat gca 1126

Leu Gln Gln Ala Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Ala

325

330

335

44/79

cca act agt tat aac gga gct gtc agg cct gga atg ctc tgt gct ggc 1174
Pro Thr Ser Tyr Asn Gly Ala Val Arg Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly

340 345 350 355

cta cct caa ggt gga gtg gat gca tgc cgg ggt gac tcg ggt ggc cca 1222
Leu Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro

360 365 370

ctg gtt caa gag gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctc gtg gga ata gta 1270
Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val

375 380 385

agc tgg ggg gac cga tgc ggt ctg cca gat aag cca gga gtg tac act 1318
Ser Trp Gly Asp Arg Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr

390 395 400

cga gtg aca gcc tac cgt gac tgg ata act gaa aaa act gga gtc tag c 1367
Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Glu Lys Thr Gly Val

405 410 415 418

acaataaaatg catcttttg aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1406

<210> 31

<211> 418

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

45 / 79

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 31

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Pro Ser Gly Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1 5 10 15

Tyr Val Val Cys Phe Val Val Val Ala Gly Val Val Ile Leu Ala Val

20 25 30

Thr Ile Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35 40 45

Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Gln Tyr Ser Asn Gln

50 55 60

Leu Asn Ser Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Leu Ile Thr Lys Thr Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Asn Gln

85 90 95

Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val

100 105 110

Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Asn Asn Asn Gly

115 120 125

Ala Leu Met Lys Ser Arg Ile Lys Ser Val Leu His Gln Met Leu Asn

130 135 140

Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Thr Glu Ile Thr Ser Ile

145 150 155 160

Thr Asp Gln Asp Thr Val Asn Ile Phe Thr Glu Gly Cys Gly Ala Arg

165 170 175

Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Leu Gly Gly Asn Lys

180 185 190

Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Lys Asn Asn

195 200 205

46 / 79

Val His His Cys Gly Gly Val Leu Ile Ser Ser Met Trp Ile Leu Ser
210 215 220
Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Gln Ser Asn Pro Arg Gln Trp Thr Ala
225 230 235 240
Ile Phe Gly Ala Ser Ile Ala Phe Pro Lys Gln Lys Arg Arg Val Arg
245 250 255
Thr Ile Leu Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Ala Thr His Glu Asn Asp
260 265 270
Ile Ala Ala Ile Gln Leu Glu Gly Ile Asn Phe Thr Lys Asn Ile
275 280 285
His Arg Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Pro Pro Gly Ser
290 295 300
Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Glu Tyr Gly Asn Thr
305 310 315 320
Val Ser Asp Leu Gln Gln Ala Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Asp Val
325 330 335
Cys Asn Ala Pro Thr Ser Tyr Asn Gly Ala Val Arg Pro Gly Met Leu
340 345 350
Cys Ala Gly Leu Pro Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Arg Gly Asp Ser
355 360 365
Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
370 375 380
Gly Ile Val Ser Trp Gly Asp Arg Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly
385 390 395 400
Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Glu Lys Thr
405 410 415
Gly Val
418

<210> 32

<211> 1381

47 / 79

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (73)...(1326)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (73)...(627)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (628)...(1326)

<400> 32

gggatttcatt tgagtgaaaa tctcagagca gttgcataagg cggaaaaaaag gacttcattta 60
ttaaggattaa aa atg tat agg cca gca cga gtg aca tca gcc tca aga tcc 111
Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Ala Ser Arg Ser

1

5

10

ctg aat cca tat cta gta ttt ttt gtt gtc gtc gca gtg gtg gtg atc 159
Leu Asn Pro Tyr Leu Val Phe Phe Val Val Val Ala Val Val Val Ile

15

20

25

ctg gca gtg atc ata ggt cta ctt gtc tac ttt tta gct ttt gat caa 207
Leu Ala Val Ile Ile Gly Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln

30

35

40

45

aaa tct tac ttt tac caa agc agc att caa atc ttt ggt aaa caa tat 255
Lys Ser Tyr Phe Tyr Gln Ser Ser Ile Gln Ile Leu Gly Lys Gln Tyr

48 /79

50

55

60

agt gat gag tta agt tca cca gct aca gag aaa tat agg act ttg agt 303
Ser Asp Glu Leu Ser Ser Pro Ala Thr Glu Lys Tyr Arg Thr Leu Ser

65

70

75

gga aga att gaa tct atg att act aaa aca ttc aaa gag tca gat tta 351
Gly Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu Ser Asp Leu

80

85

90

aaa aat gag ttc atc aaa gct cat gtt gtc aaa ctg agg caa agt ggc 399
Lys Asn Glu Phe Ile Lys Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly

95

100

105

aat aat gtg ata gca gat att atc atg aaa ttt aaa ttc acc aga aga 447
Asn Asn Val Ile Ala Asp Ile Ile Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Arg

110

115

120

125

atc aat gaa gca tca atg aaa agc aga att gag tct att ita cgc caa 495
Ile Asn Glu Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Ile Leu Arg Gln

130

135

140

atg ccg aat aac tct gaa gac ttg aac atg aat cca act cag gta ata 543
Met Pro Asn Asn Ser Glu Asp Leu Asn Met Asn Pro Thr Gln Val Ile

145

150

155

tca ata act ggc cag gat aca ata caa ctg ttc act cga gaa tgt ggg 591
Ser Ile Thr Gly Gln Asp Thr Ile Gln Leu Phe Thr Arg Glu Cys Gly

160

165

170

gtc cgc tca gac ctg ata acc ttg tct gag gag aga atc ata gga ggc 639

49 / 79

Val Arg Ser Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly

175 180 185

agt aaa gct gag aaa gga gac tgg cca tgg caa gtc agt cta cag tgg 687

Ser Lys Ala Glu Lys Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Trp

190 195 200 205

agc agt tct cac cgc tgc gga gga gcc ttg atc agt aat agg tgg atc 735

Ser Ser Ser His Arg Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile

210 215 220

ctg tca gca gct cac tgc ttc aga agc cac tct gat cct cgc caa tgg 783

Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Arg Ser His Ser Asp Pro Arg Gln Trp

225 230 235

att gcc acc ttt ggt act tcc aca ata tct cct caa ctg aga gta gga 831

Ile Ala Thr Phe Gly Thr Ser Thr Ile Ser Pro Gln Leu Arg Val Gly

240 245 250

gta agg aat att tta atc cat gac aat tat aaa cct gaa act cat gaa 879

Val Arg Asn Ile Leu Ile His Asp Asn Tyr Lys Pro Glu Thr His Glu

255 260 265

aac gat att gca ctc gta caa ctt gat aga gaa gtc acc ttt aac aga 927

Asn Asp Ile Ala Leu Val Gln Leu Asp Arg Glu Val Thr Phe Asn Arg

270 275 280 285

tat att cat aca gtg tgg ctc cca gag gct aac cag gcc att tca gct 975

Tyr Ile His Thr Val Cys Leu Pro Glu Ala Asn Gln Ala Ile Ser Ala

290 295 300

50 /'79

ggt tcc act gct tat gta aca gga tgg gga tct cag agt tat agc ggc 1023
Gly Ser Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Ser Tyr Ser Gly

305

310

315

agc aca gtt tca gat cta aac caa gga cgg gtc aat ata ata agt aat 1071
Ser Thr Val Ser Asp Leu Asn Gln Gly Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn

320

325

330

act gta tgt aac aca cca gct ggt tat aat gga gcc gtc ctg tct gga 1119
Thr Val Cys Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Asn Gly Ala Val Leu Ser Gly

335

340

345

atg cta tgt gct gga cta cct gaa ggt gga gtg gac gcg tgc cag ggt 1167
Met Leu Cys Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly

350

355

360

365

gac tct ggt ggc cct cta gta caa gaa gac tca cgg caa cac tgg ttc 1215
Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Gln His Trp Phe

370

375

380

atc gtg ggg ata gta agc tgg ggg tat caa tgt ggt ctg cca gat aaa 1263
Ile Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys

385

390

395

cca gga gta tac act aga gtg aca gcc tac cgt gac tgg ata acc caa 1311
Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Gln

400

405

410

caa act ggt atc tag tgcataaat acatcttggt tcaagagcca aaaaaaaaaa a 1367
Gln Thr Gly Ile

415

417

51/79

aaaaaaaaaaa aaaa 1381

<210> 33

<211> 417

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(185)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (186)...(417)

<400> 33

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Val Thr Ser Ala Ser Arg Ser Leu Asn Pro

1 5 10 15

Tyr Leu Val Phe Phe Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val

20 25 30

Ile Ile Gly Leu Leu Val Tyr Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Tyr

35 40 45

Phe Tyr Gln Ser Ser Ile Gln Ile Leu Gly Lys Gln Tyr Ser Asp Glu

50 55 60

Leu Ser Ser Pro Ala Thr Glu Lys Tyr Arg Thr Leu Ser Gly Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Met Ile Thr Lys Thr Phe Lys Glu Ser Asp Leu Lys Asn Glu

85 90 95

Phe Ile Lys Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Ser Gly Asn Asn Val

100 105 110

52 / 79

Ile Ala Asp Ile Ile Met Lys Phe Lys Phe Thr Arg Arg Ile Asn Glu
115 120 125
Ala Ser Met Lys Ser Arg Ile Glu Ser Ile Leu Arg Gln Met Pro Asn
130 135 140
Asn Ser Glu Asp Leu Asn Met Asn Pro Thr Gln Val Ile Ser Ile Thr
145 150 155 160
Gly Gln Asp Thr Ile Gln Leu Phe Thr Arg Glu Cys Gly Val Arg Ser
165 170 175
Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Ser Lys Ala
180 185 190
Glu Lys Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Trp Ser Ser Ser
195 200 205
His Arg Cys Gly Gly Ala Leu Ile Ser Asn Arg Trp Ile Leu Ser Ala
210 215 220
Ala His Cys Phe Arg Ser His Ser Asp Pro Arg Gln Trp Ile Ala Thr
225 230 235 240
Phe Gly Thr Ser Thr Ile Ser Pro Gln Leu Arg Val Gly Val Arg Asn
245 250 255
Ile Leu Ile His Asp Asn Tyr Lys Pro Glu Thr His Glu Asn Asp Ile
260 265 270
Ala Leu Val Gln Leu Asp Arg Glu Val Thr Phe Asn Arg Tyr Ile His
275 280 285
Thr Val Cys Leu Pro Glu Ala Asn Gln Ala Ile Ser Ala Gly Ser Thr
290 295 300
Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Gln Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Val
305 310 315 320
Ser Asp Leu Asn Gln Gly Arg Val Asn Ile Ile Ser Asn Thr Val Cys
325 330 335
Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Asn Gly Ala Val Leu Ser Gly Met Leu Cys
340 345 350
Ala Gly Leu Pro Glu Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly

53 / 79

355

360

365

Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Gln His Trp Phe Ile Val Gly

370

375

380

Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly Val

385

390

395

400

Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Thr Gln Gln Thr Gly

405

410

415

Ile

417

<210> 34

<211> 1419

<212> DNA

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<221> CDS

<222> (73)...(1329)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (73)...(630)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (631)...(1329)

<400> 34

gtcactttag tggaaatctc aaaggcagtgt gattggcaga aaaataggac ctcttcgcta 60
ctcaggatata aa atg tat agg cca gca cgg gga tca tcg act tca aga ttc 111

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Gly Ser Ser Thr Ser Arg Phe

54 / 79

1

5

10

ctg aat cca tac gtg att tgt ttc att gtt gta gca gtc gtg gtg atc 159

Leu Asn Pro Tyr Val Ile Cys Phe Ile Val Val Ala Val Val Ile

15

20

25

ctg gca gtg atc gta gct cta ctt att cac ttt tta gct ttt gat aaa 207

Leu Ala Val Ile Val Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys

30

35

40

45

aag tct tgc ttt ttt cac agc agc ttt caa att cga aat gtt caa tat 255

Lys Ser Cys Phe Phe His Ser Ser Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Tyr

50

55

60

agc gat cag tta aat tca cca gct aca cag gaa tac aga tta ttg agt 303

Ser Asp Gln Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Leu Ser

65

70

75

gaa aga att gaa tct atg att agt caa aca cta caa gga tca aac tta 351

Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Ser Gln Thr Leu Gln Gly Ser Asn Leu

80

85

90

aga aat cag ttc att aga gct cat gtt gtc aaa ctg agg cag gat agt 399

Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Asp Ser

95

100

105

aat agt gtg ata gca gat gtt gta atg aaa ttc cga gtc agt aga aac 447

Asn Ser Val Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Val Ser Arg Asn

110

115

120

125

aac aat ggt gat gca atg aaa aga agg gtt cag gat gtt ita cag caa 495

55 / 79

Asn Asn Gly Asp Ala Met Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Leu Gln Gln

130

135

140

atg ctg aat aac tct gga agc ttg gaa ata aac cct tca act acg gta 543

Met Leu Asn Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Thr Val

145

150

155

aca gag att act ggc cag gat aca gaa act atc ttc acc caa caa tgt 591

Thr Glu Ile Thr Gly Gln Asp Thr Glu Thr Ile Phe Thr Gln Gln Cys

160

165

170

ggg gcc cgt cca gac cta ata aca ttg tct gaa gag aga atc att gga 639

Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly

175

180

185

ggc acc cag gct gag gag gga gac tgg ccc tgg caa gtc agt ctc cag 687

Gly Thr Gln Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln

190

195

200

205

ccc aac aat gct cac cat tgt gga ggc att ttg atc agt aac acg tgg 735

Pro Asn Asn Ala His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Thr Trp

210

215

220

atc ctg aca gca gca cac tgc ttc cgg agc tac tct gat cct cgt caa 783

Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln

225

230

235

tgg act gcc acc ttt ggt att tcc aca gca gtt tct aga cag aga atg 831

Trp Thr Ala Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ala Val Ser Arg Gln Arg Met

240

245

250

56 / 79

aga ata agg aca att tta gtc cat aac aat tat aga tct gca acg cat 879
Arg Ile Arg Thr Ile Leu Val His Asn Asn Tyr Arg Ser Ala Thr His

255 260 265

gaa aat gat att gca gct gtg caa ctt gaa gga gct atc aca ttt aca 927
Glu Asn Asp Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Gly Ala Ile Thr Phe Thr
270 275 280 285

aga aac atc cat agt gtg tgt ctc cca gag gcc act cag aac att aca 975
Arg Asn Ile His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Thr

290 295 300

cct ggt tct tca gct tat gta aca gga tgg ggg tct cta gaa tat ggt 1023
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Glu Tyr Gly
305 310 315

ggc aac acg gtt acc tat cta cag caa gga cgg gtc aga ata ata agt 1071
Gly Asn Thr Val Thr Tyr Leu Gln Gln Gly Arg Val Arg Ile Ile Ser
320 325 330

aat gaa gta tgt aac gca cca gcg agt tac aat ggc gct gtc ttg cct 1119
Asn Glu Val Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro
335 340 345

aca atg gtg tgt gca gga tta tct caa gga gga gtg gac gca tgc cag 1167
Thr Met Val Cys Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln
350 355 360 365

ggt gac tct ggt ggc cca ctg gta caa gaa gac tcg cgc cgg ctt tgg 1215
Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp
370 375 380

57 / 79

ttc gtt gtg ggc att gta agc tgg ggc tat cag tgt ggc ctg cct gac 1263
Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp

385

390

395

aaa cca gga gtg tac aca cga gtg aca gcc tac cgt gac tgg att aga 1311
Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Arg

400

405

410

gaa caa acg ggg atc tag ctggataaat gcaccccttgtc tgcaaagccg gttcgcaa 1367
Glu Gln Thr Gly Ile

415

418

ctgagccgtg caaaaatcca agctttaatt ctccgcgtgaa aagaacagga ag 1419

<210> 35

<211> 418

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 35

Met Tyr Arg Pro Ala Arg Gly Ser Ser Thr Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1

5

10

15

58 / 79

Tyr Val Ile Cys Phe Ile Val Val Ala Val Val Val Ile Leu Ala Val
20 25 30
Ile Val Ala Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys Lys Ser Cys
35 40 45
Phe Phe His Ser Ser Phe Gln Ile Arg Asn Val Gln Tyr Ser Asp Gln
50 55 60
Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg Leu Leu Ser Glu Arg Ile
65 70 75 80
Glu Ser Met Ile Ser Gln Thr Leu Gln Gly Ser Asn Leu Arg Asn Gln
85 90 95
Phe Ile Arg Ala His Val Val Lys Leu Arg Gln Asp Ser Asn Ser Val
100 105 110
Ile Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Val Ser Arg Asn Asn Asn Gly
115 120 125
Asp Ala Met Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Leu Gln Gln Met Leu Asn
130 135 140
Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Asn Pro Ser Thr Thr Val Thr Glu Ile
145 150 155 160
Thr Gly Gln Asp Thr Glu Thr Ile Phe Thr Gln Gln Cys Gly Ala Arg
165 170 175
Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ile Gly Gly Thr Gln
180 185 190
Ala Glu Glu Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Pro Asn Asn
195 200 205
Ala His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Thr Trp Ile Leu Thr
210 215 220
Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asp Pro Arg Gln Trp Thr Ala
225 230 235 240
Thr Phe Gly Ile Ser Thr Ala Val Ser Arg Gln Arg Met Arg Ile Arg
245 250 255
Thr Ile Leu Val His Asn Asn Tyr Arg Ser Ala Thr His Glu Asn Asp

59 / 79

260

265

270

Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Gly Ala Ile Thr Phe Thr Arg Asn Ile

275

280

285

His Ser Val Cys Leu Pro Glu Ala Thr Gln Asn Ile Thr Pro Gly Ser

290

295

300

Ser Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Glu Tyr Gly Gly Asn Thr

305

310

315

320

Val Thr Tyr Leu Gln Gln Gly Arg Val Arg Ile Ile Ser Asn Glu Val

325

330

335

Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Thr Met Val

340

345

350

Cys Ala Gly Leu Ser Gln Gly Gly Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser

355

360

365

Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Val Val

370

375

380

Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asp Lys Pro Gly

385

390

395

400

Val Tyr Thr Arg Val Thr Ala Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Glu Gln Thr

405

410

415

Gly Ile

418

<210> 36

<211> 1576

<212> DNA

<213> Cavia porcellus

<220>

<221> CDS

<222> (102)...(1358)

60 / 79

<220>

<221> propeptide portion

<222> (102)...(659)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (660)...(1358)

<400> 36

ggacttctgc tcctcagaca ctcaagactc cagtcatttc agtggaaatc tcaaaggagt 60
tgacaaggcag gagaacgatc gttcatctt tcaggataaa g atg tat agg cca gca 116
Met Tyr Arg Pro Ala

1

5

aca gtg tca tct aac tcg aga ttc ctg aac ccc tgg gta gtc ttc 164

Thr Val Ser Ser Asn Ser Arg Phe Leu Asn Pro Trp Val Val Phe Phe

10

15

20

act gtg ttc gcg gtg gtg ggg atc ctg gcc atg att gta gga ctg ctc 212

Thr Val Phe Ala Val Val Gly Ile Leu Ala Met Ile Val Gly Leu Leu

25

30

35

att cac ttt tta gct ttt gat caa aaa tct tgc ttt tac cac agt gat 260

Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Cys Phe Tyr His Ser Asp

40

45

50

gtt caa ata atg aat gtt gaa tac aat gat cag tta agc tca ccc ggt 308

Val Gln Ile Met Asn Val Glu Tyr Asn Asp Gln Leu Ser Ser Pro Gly

55

60

65

aca caa gaa tac agg att ttg agt gaa agg att gaa tct atg atc act 356

61 / 79

Thr Gln Glu Tyr Arg Ile Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr

70

75

80

85

aat gca ttc cag cag tcc aat tta aga aat cag ttt atc aga gcc cat 404

Asn Ala Phe Gln Gln Ser Asn Leu Arg Asn Gln Phe Ile Arg Ala His

90

95

100

gtt gta aga ctg agg caa gag ggt aac ggt gtg gta gca gat gtt gtc 452

Val Val Arg Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val Val Ala Asp Val Val

105

110

115

atg aag ttt cga ttc agt aga cgt aac aat gga gaa tcc atg aaa gcc 500

Met Lys Phe Arg Phe Ser Arg Arg Asn Asn Gly Glu Ser Met Lys Ala

120

125

130

aga att cag tct att tta cag caa atg ctg aat aac tct gga aac ctg 548

Arg Ile Gln Ser Ile Leu Gln Gln Met Leu Asn Asn Ser Gly Asn Leu

135

140

145

gaa ata agc cct tca gcc ggg gta aca gaa att aac gac cag gaa aca 596

Glu Ile Ser Pro Ser Ala Gly Val Thr Glu Ile Asn Asp Gln Glu Thr

150

155

160

165

gaa aat atg ttt act caa gca tgc ggg gcc cgt cca gac ctg atg acg 644

Glu Asn Met Phe Thr Gln Ala Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Met Thr

170

175

180

ctg tct gca gag aga gtc gtt gga ggt act caa gct gac cag ggc gac 692

Leu Ser Ala Glu Arg Val Val Gly Gly Thr Gln Ala Asp Gln Gly Asp

185

190

195

62 / 79

tgg ccg tgg caa gtc agt ctg cag gtc aac ggt ggc cat cgc tgc gga 740
Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Asn Gly Gly His Arg Cys Gly

200

205

210

ggc gtc ctg gtc agc aac cag tgg gtc ctg act gca gcc cac tgc ttc 788
Gly Val Leu Val Ser Asn Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe

215

220

225

aga agc tac cct aat gct caa caa tgg act gcc acc ttt ggt att tcc 836
Arg Ser Tyr Pro Asn Ala Gln Gln Trp Thr Ala Thr Phe Gly Ile Ser
230 235 240 245

aca acc tct cct act ctg aga gtg aga gtg agg act att tca atc cac 884
Thr Thr Ser Pro Thr Leu Arg Val Arg Val Arg Thr Ile Ser Ile His

250

255

260

aac aat tac aat cct gtg act cat gag aat gat att gca gct gtg cag 932
Asn Asn Tyr Asn Pro Val Thr His Glu Asn Asp Ile Ala Ala Val Gln
265 270 275

ctg gaa agg gct gtc acc ttc acc agg gat gtt cac cga gta tgt ctc 980
Leu Glu Arg Ala Val Thr Phe Thr Arg Asp Val His Arg Val Cys Leu

280

285

290

ccc gca gcc acc cag act gtc aca cct ggt tct aca gct tat gta aca 1028
Pro Ala Ala Thr Gln Thr Val Thr Pro Gly Ser Thr Ala-Tyr Val Thr

295

300

305

gga tgg ggc tcg ata atc tat ggt ggc aac acg gtc aga tat cta cgg 1076
Gly Trp Gly Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Asn Thr Val Arg Tyr Leu Arg
310 315 320 325

63 / 79

caa gga caa gtc cag ata ata agt act agt gag tgt aac gca cca gcc 1124
Gln Gly Gln Val Gln Ile Ile Ser Thr Ser Glu Cys Asn Ala Pro Ala

330

335

340

agt tac aac ggt gct gtc ctg cct ggg atg ctg tgt gct ggc gtg ccg 1172
Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro

345

350

355

aca ggt gca gtg gac gcg tgc cag gga gat tct ggt ggc cca cta gtc 1220
Thr Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val

360

365

370

caa gaa gac tca cgg cgg ctt tgg ttc ctg gtg gga ata gtg agc tgg 1268
Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val Gly Ile Val Ser Trp

375

380

385

ggc tat cag tgt ggt gtg ccc gac aag ccc gga gta tat act cga gtg 1316
Gly Tyr Gln Cys Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val

390

395

400

405

acc aca tac cgt aac tgg att aga caa gta act ggg gtc tag cgcaaccca 1367
Thr Thr Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Val Thr Gly Val

410

415

418

tgcatttcgt ttgcaaagtg atcaagtgca ataaatgcat ctctgttgca aagtctgaat 1427
gcagggtgtc ctggctacaa ttccaaagct ttactttca gcagaaaaat aaagctgcgc 1487
ttgtttcatt ttacataact gttacaaaat agagcagaat aaaacattat tcactcttcc 1547
tcaaaaaaaaaaaaaaaa 1576

64 / 79

<211> 418

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(186)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (187)...(418)

<400> 37

Met Tyr Arg Pro Ala Thr Val Ser Ser Asn Ser Arg Phe Leu Asn Pro

1 5 10 15

Trp Val Val Phe Phe Thr Val Phe Ala Val Val Gly Ile Leu Ala Met

20 25 30

Ile Val Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Gln Lys Ser Cys

35 40 45

Phe Tyr His Ser Asp Val Gln Ile Met Asn Val Glu Tyr Asn Asp Gln

50 55 60

Leu Ser Ser Pro Gly Thr Gln Glu Tyr Arg Ile Leu Ser Glu Arg Ile

65 70 75 80

Glu Ser Met Ile Thr Asn Ala Phe Gln Gln Ser Asn Leu Arg Asn Gln

85 90 95

Phe Ile Arg Ala His Val Val Arg Leu Arg Gln Glu Gly Asn Gly Val

100 105 110

Val Ala Asp Val Val Met Lys Phe Arg Phe Ser Arg Arg Asn Asn Gly

115 120 125

Glu Ser Met Lys Ala Arg Ile Gln Ser Ile Leu Gln Gln Met Leu Asn

130 135 140

65/79

Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Ser Pro Ser Ala Gly Val Thr Glu Ile
145 150 155 160
Asn Asp Gln Glu Thr Glu Asn Met Phe Thr Gln Ala Cys Gly Ala Arg
165 170 175
Pro Asp Leu Met Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Val Gly Thr Gln
180 185 190
Ala Asp Gln Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Asn Gly
195 200 205
Gly His Arg Cys Gly Gly Val Leu Val Ser Asn Gln Trp Val Leu Thr
210 215 220
Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Pro Asn Ala Gln Gln Trp Thr Ala
225 230 235 240
Thr Phe Gly Ile Ser Thr Thr Ser Pro Thr Leu Arg Val Arg Val Arg
245 250 255
Thr Ile Ser Ile His Asn Asn Tyr Asn Pro Val Thr His Glu Asn Asp
260 265 270
Ile Ala Ala Val Gln Leu Glu Arg Ala Val Thr Phe Thr Arg Asp Val
275 280 285
His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Thr Val Thr Pro Gly Ser
290 295 300
Thr Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Ile Ile Tyr Gly Gly Asn Thr
305 310 315 320
Val Arg Tyr Leu Arg Gln Gly Gln Val Gln Ile Ile Ser Thr Ser Glu
325 330 335
Cys Asn Ala Pro Ala Ser Tyr Asn Gly Ala Val Leu Pro Gly Met Leu
340 345 350
Cys Ala Gly Val Pro Thr Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser
355 360 365
Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Arg Leu Trp Phe Leu Val
370 375 380
Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly

66 / 79

385 390 395 400

Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asn Trp Ile Arg Gln Val Thr

405 410 415

Gly Val

418

<210> 38

<211> 1538

<212> DNA

<213> *Mesocricetus auratus*

<220>

<221> CDS

<222> (206)...(1459)

<220>

<221> propeptide portion

<222> (206)...(760)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (761)...(1459)

<400> 38

gccccagtc tcaattctgg tcccaagtac agtgttggtt caaggtagt ctttcagact 60
tgttttgcaa gtttaggtttt aattacatgg gatitccctcc ttggctca gatacacata 120
gcacaaaaga gtcactcaat tgagtgggaa tctcaaagca tctggacaca cagaagaaag 180
gaccctcgcca ttactcagga gtaaa atg tat agg cca aga cca gtg ata cca 232

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Val Ile Pro

67 /79

caa tca agg ttc ttc agt ccg ttt gta gtg gct ttt gtt gtc ata aca 280
Gln Ser Arg Phe Phe Ser Pro Phe Val Val Ala Phe Val Val Ile Thr
10 15 20 25

acR gta ctg atc ctg gcc atg act ata ggt cta ctt att cac ttc tta 328
Thr Val Leu Ile Leu Ala Met Thr Ile Gly Leu Leu Ile His Phe Leu
30 35 40

gct ttt gac aag aaa act tac ttt tac cac agc agc ttt caa atc cta 376
Ala Phe Asp Lys Lys Thr Tyr Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu
45 50 55

aat gtt gaa tac act gag gct tta aat tcc cca gct aca cag gaa tac 424
Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr
60 65 70

agg cat ttg agt gaa aga att gaa tct atg att act gat gca ttc cga 472
Arg His Leu Ser Glu Arg Ile Glu Ser Met Ile Thr Asp Ala Phe Arg
75 80 85

gaa tca aat tta aga agt gag ttt atc aga aca cac gtt gtt aaa ctg 520
Glu Ser Asn Leu Arg Ser Glu Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu
90 95 100 105

agg aaa gaa ggg aat ggt gtg atc gca gat gct gtc atg aaa ttt cga 568
Arg Lys Glu Gly Asn Gly Val Ile Ala Asp Ala Val Met Lys Phe Arg
110 115 120

tct agt aaa cgc agc aat aga aaa tcc atg aaa aac aga att cat tct 616
Ser Ser Lys Arg Ser Asn Arg Lys Ser Met Lys Asn Arg Ile His Ser
125 130 135

68 / 79

gtg cta caa ata ctg agt aac tct gga agt ttg gaa ata acc cct tca 664
Val Leu Gln Ile Leu Ser Asn Ser Gly Ser Leu Glu Ile Thr Pro Ser

140 145 150

aat gag ata aca tca ctc act gac caa gat aca gaa aat ttt ttg act 712
Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr Asp Gln Asp Thr Glu Asn Phe Leu Thr

155 160 165

caa gaa tgt gga gcc cgt cca gac ctt ata aca ctg tca gaa gag aga 760
Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg

170 175 180 185

gtt att gga ggc act cta gct gaa aca ggt gac tgg ccc tgg caa gtc 808
Val Ile Gly Gly Thr Leu Ala Glu Thr Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val

190 195 200

agt cta caa ctc aat aat gtc cac cac tgt gga ggt atc ctg atc agt 856
Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser

205 210 215

aac ttg tgg gtc ctg aca gca gct cac tgc ttc aga agc tac tct aat 904
Asn Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asn

220 225 230

cct cta caa tgg act gcc acc ttt ggt gtt tct aca ata cgt cct atc 952
Pro Leu Gln Trp Thr Ala Thr Phe Gly Val Ser Thr Ile Arg Pro Ile

235 240 245

tta aga gta aga gta agg tct att gta tcc cat aac aat tac aga cct 1000
Leu Arg Val Arg Val Arg Ser Ile Val Ser His Asn Asn Tyr Arg Pro

69 / 79

250 255 260 265

aca act cgt gat aat gat att gca gtt gta caa ctt gaa aga cct atc 1048
Thr Thr Arg Asp Asn Asp Ile Ala Val Val Gln Leu Glu Arg Pro Ile

270 275 280

acc ttt aac aga aat atc cac agg gtg tgt ctc cca gct gcg acc caa 1096
Thr Phe Asn Arg Asn Ile His Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln

285 290 295

agt atc ata cct ggt tct att gca tat gtc aca gga tgg ggg tcg ctc 1144
Ser Ile Ile Pro Gly Ser Ile Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu

300 305 310

act tat gga ggc aac aca gtc acc gat cta cgg caa gga cag gtc aga 1192
Thr Tyr Gly Gly Asn Thr Val Thr Asp Leu Arg Gln Gly Gln Val Arg

315 320 325

ata gta agt acc gac gag tgc aat gaa cca gct ggg tac agt gga agc 1240
Ile Val Ser Thr Asp Glu Cys Asn Glu Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser
330 335 340 345

gtc ttg cct gga atg ctc tgt gct gga gtg cct tca ggt gct gtg gat 1288
Val Leu Pro Gly Met Leu Cys Ala Gly Val Pro Ser Gly Ala Val Asp

350 355 360

gct tgc caa ggt gat tct ggt ggc cca cta gta cag gaa gac tca cgg 1336
Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg

365 370 375

atg ctt tgg ttt gtt gtg ggg att gta agc tgg gga tat cag tgc ggc 1384

70 / 79

Met Leu Trp Phe Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gin Cys Gly

380

385

390

ctg cca aat aaa cca gga gtg tac acg cga gtg aca acc tac cgc gac 1432

Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp

395

400

405

tgg att cgc cag caa gct gga gtc tag tgccacgaaa ggccgtgtgaa gtttgtg 1486

Trp Ile Arg Gln Gln Ala Gly Val

410

415

417

tgcaaatgtc ctgactcaga ttcaactgca aaagaaaccg gaatgtcat tt 1538

<210> 39

<211> 417

<212> PRT

<213> Mesocricetus auratus

<220>

<221> propeptide portion

<222> (1)...(185)

<220>

<221> trypsin-like protein portion

<222> (186)...(417)

<400> 39

Met Tyr Arg Pro Arg Pro Val Ile Pro Gin Ser Arg Phe Phe Ser Pro

1

5

10

15

Phe Val Val Ala Phe Val Val Ile Thr Thr Val Leu Ile Leu Ala Met

20

25

30

71 / 79

Thr Ile Gly Leu Leu Ile His Phe Leu Ala Phe Asp Lys Lys Thr Tyr
35 40 45
Phe Tyr His Ser Ser Phe Gln Ile Leu Asn Val Glu Tyr Thr Glu Ala
50 55 60
Leu Asn Ser Pro Ala Thr Gln Glu Tyr Arg His Leu Ser Glu Arg Ile
65 70 75 80
Glu Ser Met Ile Thr Asp Ala Phe Arg Glu Ser Asn Leu Arg Ser Glu
85 90 95
Phe Ile Arg Thr His Val Val Lys Leu Arg Lys Glu Gly Asn Gly Val
100 105 110
Ile Ala Asp Ala Val Met Lys Phe Arg Ser Ser Lys Arg Ser Asn Arg
115 120 125
Lys Ser Met Lys Asn Arg Ile His Ser Val Leu Gln Ile Leu Ser Asn
130 135 140
Ser Gly Ser Leu Glu Ile Thr Pro Ser Asn Glu Ile Thr Ser Leu Thr
145 150 155 160
Asp Gln Asp Thr Glu Asn Phe Leu Thr Gln Glu Cys Gly Ala Arg Pro
165 170 175
Asp Leu Ile Thr Leu Ser Glu Glu Arg Val Ile Gly Gly Thr Leu Ala
180 185 190
Glu Thr Gly Asp Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Leu Asn Asn Val
195 200 205
His His Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Asn Leu Trp Val Leu Thr Ala
210 215 220
Ala His Cys Phe Arg Ser Tyr Ser Asn Pro Leu Gln Trp Thr Ala Thr
225 230 235 240
Phe Gly Val Ser Thr Ile Arg Pro Ile Leu Arg Val Arg Val Arg Ser
245 250 255
Ile Val Ser His Asn Asn Tyr Arg Pro Thr Thr Arg Asp Asn Asp Ile
260 265 270
Ala Val Val Gln Leu Glu Arg Pro Ile Thr Phe Asn Arg Asn Ile His

72 /79

275 280 285
Arg Val Cys Leu Pro Ala Ala Thr Gln Ser Ile Ile Pro Gly Ser Ile
290 295 300
Ala Tyr Val Thr Gly Trp Gly Ser Leu Thr Tyr Gly Gly Asn Thr Val
305 310 315 320
Thr Asp Leu Arg Gln Gly Gln Val Arg Ile Val Ser Thr Asp Glu Cys
325 330 335
Asn Glu Pro Ala Gly Tyr Ser Gly Ser Val Leu Pro Gly Met Leu Cys
340 345 350
Ala Gly Val Pro Ser Gly Ala Val Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
355 360 365
Gly Pro Leu Val Gln Glu Asp Ser Arg Met Leu Trp Phe Val Val Gly
370 375 380
Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gln Cys Gly Leu Pro Asn Lys Pro Gly Val
385 390 395 400
Tyr Thr Arg Val Thr Thr Tyr Arg Asp Trp Ile Arg Gln Gln Ala Gly
405 410 415
Val
417

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

ctggccstgg caagttagtc t. 21

73 / 79

<210> 41

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

tgggrrccctg acwgcmgcyc aytgcitca 29

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

tgwggtcttcy tgkactagyg ggccacc 27

<210> 43

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

74 / 79

caytgatmkc cccagctiyac waibccac 29

<210> 44

<211> 1998

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> fused DNA for human EGF and human placental alkalyne phosphatase

<400> 44

atg aag ctg ctg ccg tcg gtg gtg ctg aag ctc ttt ctg gct gca gtt 48

Met Lys Leu Leu Pro Ser Val Val Leu Lys Leu Phe Leu Ala Ala Val

1

5

10

15

ctc tcg gca ctg gtg act ggc gag agc ctg gag cgg cit cgg aga ggg 96

Leu Ser Ala Leu Val Thr Gly Glu Ser Leu Glu Arg Leu Arg Arg Gly

20

25

30

cta gct gct gga acc agc aac ccg gac cct ccc act gta tcc acg gac 144

Leu Ala Ala Gly Thr Ser Asn Pro Asp Pro Pro Thr Val Ser Thr Asp

35

40

45

cag ctg cta ccc cta gga ggc ggc cgg gac cgg aaa gtc cgt gac ttg 192

Gln Leu Leu Pro Leu Gly Gly Arg Asp Arg Lys Val Arg Asp Leu

50

55

60

caa gag gca gat ctg gac ctt ttg aga gtc act tta tcc tcc aag cca 240

Gln Glu Ala Asp Leu Asp Leu Leu Arg Val Thr Leu Ser Ser Lys Pro

65

70

75

80

caa gca ctg gcc aca cca aac aag gag gag cac ggg aaa aga aag aag 288

75/79

Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg Lys Lys

85

90

95

aaa ggc aag ggg cta ggg aag aag agg gac cca tgc ctt cgaa tac 336
Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg Lys Tyr

100

105

110

aag gac ttc tgc atc cat gga gaa tgc aaa tat gtg aag gag ctc cg 384
Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu Leu Arg
115 120 125gct ccc tcc tgc atc tgc cac ccg ggt tac cat gga gag agg tgc cat 432
Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg Cys His
130 135 140ggg ctg agc ctc cca gtg gaa aat cgc tta tat acc tat gac cac aca 480
Gly Leu Ser Leu Pro Val Glu Asn Arg Leu Tyr Thr Tyr Asp His Thr
145 150 155 160acc atc ctg atc atc cca gtt gag gag gag aac ccg gac ttc tgg aac 528
Thr Ile Leu Ile Ile Pro Val Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
165 170 175cgc gag gca gcc gag gcc ctg ggt gcc gcc aag aag ctg cag cct gca 576
Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
180 185 190cag aca gcc gcc aag aac ctc atc atc ttc ctg ggc gat ggg atg ggg 624
Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly
195 200 205

76 / 77

gig tct acg gtg aca gct gcc agg atc cta aaa ggg cag aag gac 672
Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp

210 215 220

aaa ctc ggg cct gag ala ccc ctg gcc atg gac cgc ttc cca tat gtg 720
Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val
225 230 235 240

gct ctg tcc aag aca tac aat gta gac aaa cat gig cca gac agt gga 768
Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly

245 250 255

gcc aca gcc acg gcc tac ctg tgc ggg gtc aag ggc aac ttc cag acc 816
Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr

260 265 270

att ggc ttg agt gca gcc gcc cgc ttt aac cag tgc aac acg aca cgc 864
Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg

275 280 285

ggc aac gag gtc atc tcc gtg atg aat cgg gcc aag aaa gca ggg aag 912
Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys

290 295 300

tca gtg gga gtg gta acc acc aca cga gtg cag cac gcc tcg cca gcc 960
Ser Val Gly Val Val Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
305 310 315 320

ggc acc tac gcc cac acg gtg aac cgc aac tgg tac tcg gac gcc gac 1008
Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp

325 330 335

77/79

gtg cct gcc tcg gcc cgc cag gag ggg tgc cag gac atc gct acg cag 1056
Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln

340

345

350

ctc atc tcc aac atg gac att gac gtg atc cta ggt gga ggc cga aag 1104
Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Arg Lys

355

360

365

tac atg ttt cgc atg gga acc cca gac cct gag tac cca gat gac tac 1152
Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr

370

375

380

agc caa ggt ggg acc agg ctg gac ggg aag aat ctg gtg cag gaa tgg 1200
Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp

385

390

395

400

ctg gcg aag cgc cag ggt gcc cgg tat gtg tgg aac cgc act gag ctc 1248
Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu

405

410

415

atg cag gct tcc ctg gac ccg tct gtg acc cat ctc atg ggt ctc ttt 1296
Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe

420

425

430

gag cct gga gac atg aaa tac gag atc cac cga gac tcc aca ctg gac 1344
Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp

435

440

445

ccc tcc ctg atg gag atg aca gag gct gcc ctg cgc ctg ctg agc agg 1392
Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg

78 / 79

450

455

460

aac ccc cgc ggc ttc ttc ctc ttc gtg gag ggt ggt cgc atc gac cat 1440

Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His

465

470

475

480

ggt cat cat gaa agc agg gct tac cgg gca ctg act gag acg atc atg 1488

Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met

485

490

495

ttc gac gac gcc att gag agg gcg ggc cag ctc acc agc gag gag gac 1536

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp

500

505

510

acg ctg agg ctc gtc act gcc gac cac tcc cac gtc ttc tcc ttc gga 1584

Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly

515

520

525

ggc tac ccc ctg cga ggg agc tcc aic ttc ggg ctg gcc cct ggc aag 1632

Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys

530

535

540

gcc cgg gac agg aag gcc tac acg gtc ctc cta tac gga aac ggt cca 1680

Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro

545

550

555

560

ggc tat gtg ctc aag gac ggc gcc cgg ccg gat gtt acc gag agc gag 1728

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu

565

570

575

agc ggg agc ccc gag tat cgg cag cag tca gca gtg ccc ctg gac gaa 1776

79 / 79

Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu

580

585

590

gag acc cac gca ggc gag gac gtg gcg ttc gcg cgc ggc ccg cag 1824

Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln

595

600

605

gcg cac ctg gtt cac ggc gtg cag gag acc ttc ata gcg cac gtc 1872

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val

610

615

620

atg gcc ttc gcc gcc tgc ctg gag ccc tac acc gcc tgc gac ctg gcg 1920

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala

625

630

635

640

ccc ccc gcc ggc acc acc gac gcc gcg cac ccg ggt tac tct aga gtc 1968

Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Tyr Ser Arg Val

645

650

655

ggg gcg gcc ggc cgc ttc gag cag aca tga 1998

Gly Ala Ala Gly Arg Phe Glu Gln Thr

660

665

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
 C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
 C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 SwissPort/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 699763 A (TEIJIN LTD.), 06 March, 1996 (06.03.96), & JP 8-89246 A	1-19, 24-27
X	Kazuyoshi YAMAOKA et al., Cloning and Characterization of cDNA for Human Airway Trypsin-like Protease. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 08 May, 1998, Vol. 273, No.19, pages 11895-11901	1-19, 24-27
X	WO 99/38973 A2 (CORIXA CORPORATION), 05 August, 1999 (05.08.99), & EP 1051489 A	14-19

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 18 October, 2001 (18.10.01)	Date of mailing of the international search report 30 October, 2001 (30.10.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07349

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20-23

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The "methods of judging therapeutic effects" as set forth in the above claims are carried out as a part of a therapy and, therefore, substantially pertain to methods for treatment by therapy.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/07349

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl' C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
 C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl' C12N 9/76, C12N 15/57, C12Q 1/37, C12N 5/10,
 C12Q 1/68, C07K 16/40, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Port/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 699763 A (TEIJIN LTD.) 6.3月.1996 (06.03.96) & JP 8-89246 A	1-19, 24-27
X	Kazuyoshi YAMAOKA et al., Cloning and Characterization of cDNA for Human Airway Trypsin-like Protease. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, May 8 1998, Vol. 273, No. 19, p. 11895-11901	1-19, 24-27
X	WO 99/38973 A2 (CORIXA CORPORATION) 5.8月.1999 (05.08.99) & EP 1051489 A	14-19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18. 10. 01	国際調査報告の発送日 30.10.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 4B 9162 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 20-23 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、上記請求の範囲の「治療効果判定方法」は、通常、治療方法の一環として行われる方法であり、実質的に治療方法に該当する。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあつた。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかつた。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.